

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ACÁCIO ANTONIO FERREIRA ZIELINSKI**

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE CHÁS: CLASSIFICAÇÃO, MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO POR TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS**

**CURITIBA**

**2015**

**ACÁCIO ANTONIO FERREIRA ZIELINSKI**

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE CHÁS: CLASSIFICAÇÃO, MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO POR TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito exigido para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

Supervisora Internacional: Prof<sup>a</sup>. Dr. Trust Beta

**CURITIBA**

**2015**

---

Z66a

Zielinski, Acácio Antonio Ferreira

Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante in vitro de chás : classificação, modelagem e otimização por técnicas quimiométricas/ Acácio Antonio Ferreira Zielinski. – Curitiba, 2015.

128 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk – Co-orientador: Daniel Granato – Supervisora Internacional: Trust Beta.

Bibliografia: p. 105-122.

1. Análise multivariada. 2. Superfícies de resposta (Estatística). 3. Flavonóides. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III. Granato, Daniel. IV. Beta, Trust. V. Título.

CDD: 663.96

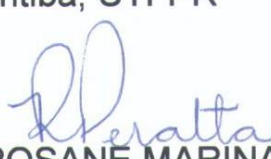
---


**ACÁCIO ANTONIO FERREIRA ZIELINSKI**

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE IN VITRO DE CHÁS: CLASSIFICAÇÃO,  
MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO POR TÉCNICAS  
QUIMIOMÉTRICAS**


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão  
formada pelos professores:

  
Orientador: Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK  
Campus Curitiba, UTFPR

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. ROSANE MARINA PERALTA  
Centro de Ciências Biológicas, UEM

  
Prof. Dr. ALESSANDRO NOGUEIRA  
Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, UEPG

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. POLIANA MACEDO DOS SANTOS  
Campus Curitiba, UTFPR

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 23 de outubro de 2015.

*Dedico este trabalho a minha família que me apoiou  
durante o período do Doutorado*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus por me dar a vida e forças para a realização deste trabalho.

A minha família por todo apoio, carinho e atenção que foram dedicados a mim durante a minha vida pessoal e profissional. Muito obrigado aos meus pais, Antonio e Zenir e a minha irmã Cyntia.

A minha noiva Jessica, por todo o amor e compreensão dos meus momentos de ausência decorrente da dedicação na realização deste trabalho. Muito obrigado por apoiar os meus sonhos e compartilhar as minhas esperanças.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelas bolsas de estudos concedidas no Brasil e no Canadá (PDSE BEX 8070/14-8).

Ao Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pela orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Granato pela coorientação.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Trust Beta pela orientação no meu estágio no exterior.

Aos Professores membros da banca por aceitarem a participação e avaliarem o trabalho.

Aos Professores Dr. Alessandro Nogueira, Dr. Ivo Mottin Demiate e Dr. Aline Alberti pelo auxílio nas análises e elaboração dos trabalhos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR.

A Universidade Federal do Paraná, a Universidade Estadual de Ponta Grossa, a Universidade de Manitoba e ao Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals pela infraestrutura disponibilizada para a realização do trabalho.

## RESUMO

Os chás são as bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo depois da água, e tem ganhado muita atenção por promoverem benefícios a saúde. Entre os efeitos benéficos incluem os efeitos anti-mutagênicos, anti-câncer e anti-apoptótica, neuroprotetivo, hiperglicêmico e anti-hiperglicêmico, antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório. Estas atividades biológicas estão associadas em parte a atividade antioxidante dos compostos químicos presentes nos chás, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos (**Capítulo 1**). O objetivo deste trabalho foi avaliar os compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* de chás consumidos no Brasil. No **Capítulo 2**, 51 chás brasileiros de oito diferentes espécies (*Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita* e *Ilex paraguariensis*) foram analisados nos termos dos compostos fenólicos, cor e atividade antioxidante *in vitro* medida por FRAP e DPPH. Os dados foram tratados usando PCA, HCA e LDA. Os resultados de ácido gálico, catequina, epicatequina, procianidina B2, quercitrina e cafeína mostraram uma correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com a atividade antioxidante. Usando a PCA foi possível ter uma abordagem adequada para checar as similaridades entre as amostras de chás, explicando 50 % da variabilidade dos dados e quatro grupos (*clusters*) foram sugeridos usando HCA. Uma classificação adequada de 82,00% foi obtida pela LDA, no qual 100% das amostras de *I. paraguariensis*, *C. citratus*, *M. recutita*, e *P. boldus* foram corretamente classificadas, enquanto que 60% dos chás de *P. anisum*, 80% de *M. piperita* e 88% foram corretamente classificadas. O **Capítulo 3** foi modelado à extração dos compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* das misturas dos chás verde, branco e preto (*Camellia sinensis*) usando um planejamento simplex-centróide acoplado com análise de regressão múltipla. Todos os modelos propostos foram significativos ( $p < 0,05$ ) e mostraram altos coeficientes de determinação ( $R^2_{adj} > 0,80$ ). Uma otimização simultânea foi realizada usando a função de desejabilidade e a condição ótima para maximizar a extração de epicatequina, epigallocatequina galato, epicatequina galato, assim com a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) foi sugerida. Portanto, no **Capítulo 3** os resultados mostraram que o chá branco foi o melhor para obter o maior teor de antioxidantes, desta forma o **Capítulo 4** foi destinado a otimizar a extração dos compostos antioxidantes deste (chá branco) por um planejamento Box-Behnker e os compostos foram identificados por LC-DAD-MS/MS. Todos os modelos propostos foram capazes de explicar mais de 85% da variação dos dados e a simultânea otimização realizada usando DPPH, ABTS, FRAP, (-)-epigallocatequina galato e (-)-epicatequina sugeriu o tempo de 10 min, a temperatura de 66 °C e a solução de 30% etanol como o ponto ótimo de extração. Os principais compostos identificados por espectroscopia de massa foram o ácido gálico, ácido 5-galoilquínico, cafeína, teobromina, galocatequina, epigallocatequina, epicatequina, epigallocatequina galato, e epicatequina galato. Portanto, este estudo mostrou que diferentes determinações analíticas associadas às ferramentas quimiométricas podem ser usadas para explorar e classificar as amostras, e podem ser usadas para processos de extração de compostos bioativos de plantas.

**Palavras-Chaves:** análise multivariada, superfície de resposta, flavonoides, cromatografia líquida de alta eficiência.

## ABSTRACT

Tea is the second most consumed beverage aside from water, and has gained much attention due to its health-promoting benefits. Among the benefit effects include antimutagenic, anticancer and anti apoptotic, neuroprotective, hypoglycemic and antihyperglycemic, antioxidant, antimicrobial, and anti inflammatory. These biological activities are associated in part to the antioxidant activity of chemical compounds present in teas, especially flavonoids and phenolic compounds (**Chapter 1**). The aim of this study was to evaluate the phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of teas consumed in Brazil. In the **Chapter 2**, 51 Brazilian teas of eight different species (*Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita* and *Ilex paraguariensis*) were analyzed in terms of the phenolic compounds, color, and *in vitro* antioxidant activity using FRAP and DPPH. The dataset was analyzed using PCA, HCA, and LDA. Gallic acid, catechin, epicatechin, procyanidin B2, quercetrin, and caffeine displayed a significant correlation ( $p < 0.05$ ) with antioxidant activity. Using the PCA was possible to have a suitable approach to check the similarities among tea samples, explaining up to 50% of data variability and four clusters were suggested by HCA. The overall classification of 82% was obtained by LDA, which 100% of samples from *I. paraguariensis*, *C. citratus*, *M. recutita*, and *P. boldus* were adroitly classified, while 60% of teas from *P. anisum*, 80% of *M. piperita*, and 88% of *C. sinensis* teas were correctly classified. **Chapter 3** was modelled the extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity from mixtures of green, white, and black teas (*Camellia sinensis*) using a simplex-centroid design couple multiple regression analysis. All proposed models were significant ( $p < 0.05$ ) and showed high determination coefficients ( $R^2_{adj} > 0.80$ ). A simultaneous optimization was performed using the desirability function and optimum point to maximize the extraction of epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, as well as the antioxidant activity (DPPH and FRAP) was suggested. Therefore, in the **Chapter 3** the results showed up that white tea was the best solution for obtaining the higher content of antioxidant compounds, then the **Chapter 4** was destined to optimize the extraction of antioxidant compounds from white tea by Box-Behnken design and the compounds were identified by LC-DAD-MS/MS. All mathematical models proposed were able to explain up more that 85% of data variation and the optimization performed using DPPH, ABTS, FRAP, (-)-epigallocatechin gallate, and (-)-epicatechin gallate suggested the time of 10 min, temperature of 66 °C and the 30% ethanol solution as optimum point. The principal compounds identified in the optimum point by mass spectrometry were gallic acid, 5-galloylquinic acid, caffeine, theobromine, galocatechin, epigallocatechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, and epicatechin gallate. Nevertheless, this study showed that different analytical determination associated chemometrics tools can be used to explore and classify the samples, thus it can be used for extraction processes of bioactive compounds of plant samples.

**Keywords:** multivariate analysis, response surface methodology, flavonoids, high liquid performance chromatography.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Diferentes espécies de ervas consumidas no Brasil como chá..	5
Figura 1.2 Exemplo do fluxograma do processamento de chás de <i>C. sinensis</i> ..	9
Figura 1.3 Esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6) dos flavonóides..	16
Figura 1.4 Estrutura de algumas moléculas de flavan-3-óis.	17
Figura 1.5 Estrutura dos flavonóis.	19
Figura 1.6 Estrutura química das metilxantinas..	20
Figura 1.7 Esquema geral do processo da análise multivariada de dados.	24

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Cromatograma obtido para diferentes chás dos compostos fenólicos determinados (A) 280 nm de <i>C. sinensis</i> , (B) 320 nm de <i>B. trimera</i> e (C) 350 nm de <i>P. boldus</i> .....	37
Figura 2.2 Estrutura química de alguns compostos medido nos chás herbais brasileiros.....	44
Figura 2.3 Gráfico de dispersão (PC1 vs. PC2) dos principais recursos da variabilidade entre as amostras de chás brasileiros..	47
Figura 2.4 Dendrograma obtido por análise hierárquica de agrupamentos para os chás brasileiros.	48
Figura 2.5 Gráfico de dispersão 2D ( <i>root 1</i> vs. <i>root 2</i> ) obtido pela análise linear discriminante para classificar os chás brasileiros baseado no conteúdo de quercetina, quercetrina, cromaticidade, flavonoides e catequina.	50

### CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Cromatograma obtido para a mistura (experimento 7) de chá verde (1,334 g), branco (0,333 g) e preto (0,333 g) para os compostos fenólicos determinados a 280 nm. ....	60
Figura 3.2 Gráficos das superfícies de resposta para mostrar os efeitos dos chás verde, branco e preto no conteúdo de (A) compostos fenólicos totais, (B) flavonoides totais, (C) taninos, (D) ABTS, (E) DPPH, (F) FRAP, (G) CUPRAC, (H) ácido gálico, (I) ácido 5-cafeoilquínico, (J) cafeína, (K) epicatequina, (L) epigallocatequina, (M) epigallocatequina galato, (N) epicatequina galato.....	73

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Gráficos da superfícies de resposta dos efeitos da temperatura, tempo e concentração de etanol.	99
--	----

Figura 4.2 Cromatogram do extrato de chá branco obtido no ponto ótimo (10 min, 66 °C, 30% de etanol) a 280 nm (A), espectro de massa para GC e EGC (B), e ECG (C). ..... 102

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais de diferentes espécies de chás..	11
Tabela 1.2 Principais ácidos fenólicos encontrados em chá herbais. ....	14
Tabela 1.3 Exemplos do uso de métodos estatísticos multivariados aplicados na avaliação de chás e infusões herbais. ....	29

### CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Parâmetros cromatográficos da cafeína e dos compostos fenólicos analisados por HPLC.....	38
Tabela 2.2 Atributos de cor, compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> dos chás brasileiros. ....	41
Tabela 2.3 Composição química dos chás comercializados no Brasil.....	43
Tabela 2.4 Dados agrupados das amostras de chás por preço, propriedades de cor, composição química e atividade antioxidante. ....	49

### CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Planejamento simplex-centróide aumentado com dez tratamento para as misturas dos chás verde, branco e preto.....	56
Tabela 3.2 Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos e cafeína analisados por HPLC.....	59
Tabela 3.3 Fenólicos totais, flavonoides, conteúdo de taninos e atividade antioxidante <i>in vitro</i> das misturas dos chás de <i>C. sinensis</i> . ....	63
Tabela 3.4 Compostos fenólicos individuais determinados por HPLC das misturas ternárias de chás.....	65
Tabela 3.5 Equações de regressão para os compostos fenólicos totais e individuais e atividade antioxidante <i>in vitro</i> como resultado da combinação dos chás verde, branco, e preto. ....	74
Tabela 3.6 Verificação experimental dos modelos de superfície de resposta usados para otimização das misturas de chás. ....	77

### CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante dos extratos de chá branco. ....	87
Tabela 4.2 LC-DAD dos extratos de chá branco. ....	89

Tabela 4.3 Efeito das variáveis independentes (tempo, temperatura, e concentração de etanol) para as diferentes variáveis avaliadas. ....	92
--	----

## LISTA DE SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
C	Catequina
C*	Chroma
CUPRAC	Capacidade antioxidante de redução do cobre
DPPH	1,1- difenil-2-picrilhidrazil
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
FRAP	Potencial antioxidante de redução do ferro
GC	Galocatequina
<i>h</i> *	Ângulo hue
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
LDA	Análise discriminante linear
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PCA	Análise de componentes principais
RSM	Metodologia de superfície de resposta
TAH/HAT	Transferência do átomo de hidrogênio
TC	Conteúdo de taninos
TFC	Conteúdo de flavonoides totais
TPC	Compostos fenólicos totais
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico
TSE	Transferência simples de elétrons

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	2
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA: Chás, compostos fenólicos e técnicas quimiométricas.	
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1 Chás .....	4
1.2 Processo de fabricação dos chás .....	7
1.3 Composição química .....	10
1.3.1 Chás e seus compostos fenólicos .....	10
1.3.1.1 Ácidos Fenólicos .....	11
1.3.1.2 Flavonóides .....	16
1.3.1.2.1 Flavan-3-óis (Flavanóis) .....	16
1.3.1.3 Flavon-3-óis (Flavonóis) .....	18
1.3.1.4 Metilxantinas (Alcalóides).....	19
1.4 Benefícios à saúde .....	20
1.5 Métodos químicos de atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	21
1.6 Quimiometria aplicada no estudo na ciência e tecnologia de alimentos .....	23
1.6.1 Análise Multivariada .....	23
1.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA) .....	25
1.6.1.2 Análise hierárquica de agrupamentos.....	25
1.6.1.3 Análise Linear Discriminante (LDA).....	26
1.6.2 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).....	27
CAPÍTULO 2: ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE DIFERENTES CHÁS BRASILEIROS USANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS.	
1 INTRODUÇÃO .....	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1 Reagentes.....	33
2.2 Amostras de chás .....	33
2.3 Procedimento de extração.....	33
2.4 Compostos fenólicos totais (TPC) .....	34

2.5	Determinação do conteúdo de flavonóides totais (TFC) .....	34
2.6	Medida da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	34
2.7	Atributos de cor .....	35
2.8	Análise dos compostos fenólicos e cafeína por HPLC .....	35
2.9	Análises estatísticas .....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4	CONCLUSÕES .....	51
CAPÍTULO 3: MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DAS MISTURAS DOS CHÁS VERDE, BRANCO E PRETO ( <i>Camellia sinensis</i> L. Kuntze).		
1	INTRODUÇÃO .....	54
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
2.1	Reagentes .....	55
2.2	Amostras de chás .....	55
2.3	Planejamento experimental .....	55
2.4	Determinação dos compostos fenólicos totais (TPC) .....	56
2.5	Determinação do conteúdo de flavonoides totais (TFC) .....	56
2.6	Determinação do conteúdo de taninos (TC) .....	57
2.7	Atividade antioxidante dos chás .....	57
2.8	Compostos fenólicos individuais e cafeína determinados por HPLC .....	58
2.9	Análise estatística .....	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
3.1	Composição química .....	62
3.2	Atividade antioxidante .....	67
3.3	Análise de correlação .....	68
3.4	Modelos de regressão múltipla (RSM) .....	69
4	CONCLUSÃO .....	78
CAPÍTULO 4: OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO CHÁ BRANCO ( <i>Camellia sinensis</i> L. Kuntze) E SUAS IDENTIFICAÇÕES POR LC-DAD-Q-TOF-MS/MS.		
1	INTRODUÇÃO .....	81
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	82
2.1	Materiais .....	82
2.2	Métodos .....	82

2.2.1 Extração dos compostos fenólicos .....	82
2.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais (TPC) .....	83
2.2.3 Determinação dos flavonoides totais (TFC) .....	83
2.2.4 Atividade antioxidante dos extratos .....	83
2.2.5 Análise de HPLC-DAD para EGCG, ECG, EC, e catequina .....	84
2.2.6 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS .....	85
2.2.7 Análise estatística .....	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	86
3.1 Composição dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante <i>in vitro</i> . ....	86
3.2 Regressão linear múltipla acoplada a RSM .....	90
3.3 Otimização e verificação dos modelos preditivos.....	100
3.4 Identificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-MS/MS nas condições ótimas ....	100
4 CONCLUSÃO .....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	104
REFERÊNCIAS .....	105



## INTRODUÇÃO

Os Chás são as bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo depois da água e vem se tornando um importante produto agrícola. As mais diversas espécies de ervas são usadas como chás no Brasil e no mundo, entre as principais espécies destacam-se: *Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita*, e *Ilex paraguariensis*. Entretanto, o país ainda apresenta um consumo relativamente baixo de chás relacionados a outros países com uma média per capita de apenas 8,5 xícaras.

O consumo de chás tem atraído muita atenção devido aos benéficos à saúde do homem, tais como, efeitos anti-mutagênicos, anti-câncer e anti-apoptótica, neuroprotetivo, hiperglicêmico e anti-hiperglicêmico, antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório. Entre os chás mais estudados no mundo têm-se os diferentes tipos dos de *C. sinensis*, e os principais efeitos proporcionados por estes estão relacionados à presença dos flavan-3-óis, mais conhecidos como catequinas, e entre estas as maiores quantidades encontradas são epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina, epicatequina-3-galato e epicatequina. Portanto, é importante monitorar a composição fenólica e a atividade biológica dos chás consumidos por grande parte da população para correlacionar seus benefícios com a saúde humana.

O controle de qualidade, o desenvolvimento e a formulação de novos alimentos por técnicas estatísticas (quimiometria) tem aumentado em muitos campos da engenharia, ciência e tecnologia de alimentos uma vez que estas ferramentas são capazes de extrair uma quantidade máxima de informações de uma grande quantidade de dados. Dentro do campo da quimiometria podemos destacar duas frentes, a análise estatística multivariada que inclui as técnicas não-supervisionadas (PCA e HCA) e as supervisionadas (LDA, PLS-DA, KNN e SIMCA) e a metodologia de superfície de resposta (RSM) acoplada com análise de regressão múltipla para descrição dos processos.

Portando, o presente trabalho teve como característica: i) avaliar os compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* de diferentes chás brasileiros usando PCA, HCA e LDA, ii) modelar e otimizar a extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de misturas de chás verde, branco e preto (*Camellia sinensis* L. Kuntze) e iii) otimizar a extração dos compostos antioxidantes do chá branco.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de diferentes tipos de chás

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Avaliar* os compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de diferentes chás brasileiros comercializados usando técnicas estatísticas multivariadas para diferenciá-los (Artigo 1).

*Modelar e Otimizar* a extração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de misturas de chás verde, branco e preto (*Camellia sinensis* L. Kuntze) (Artigo 2).

*Otimizar* a extração de compostos antioxidantes do chá branco (*C. sinensis*) por RSM e *identificar* os compostos fenólicos individuais por LC-DAD-Q-TOF-MS/MS (Artigo 3).

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

**Chás, compostos fenólicos e técnicas quimiométricas.**

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

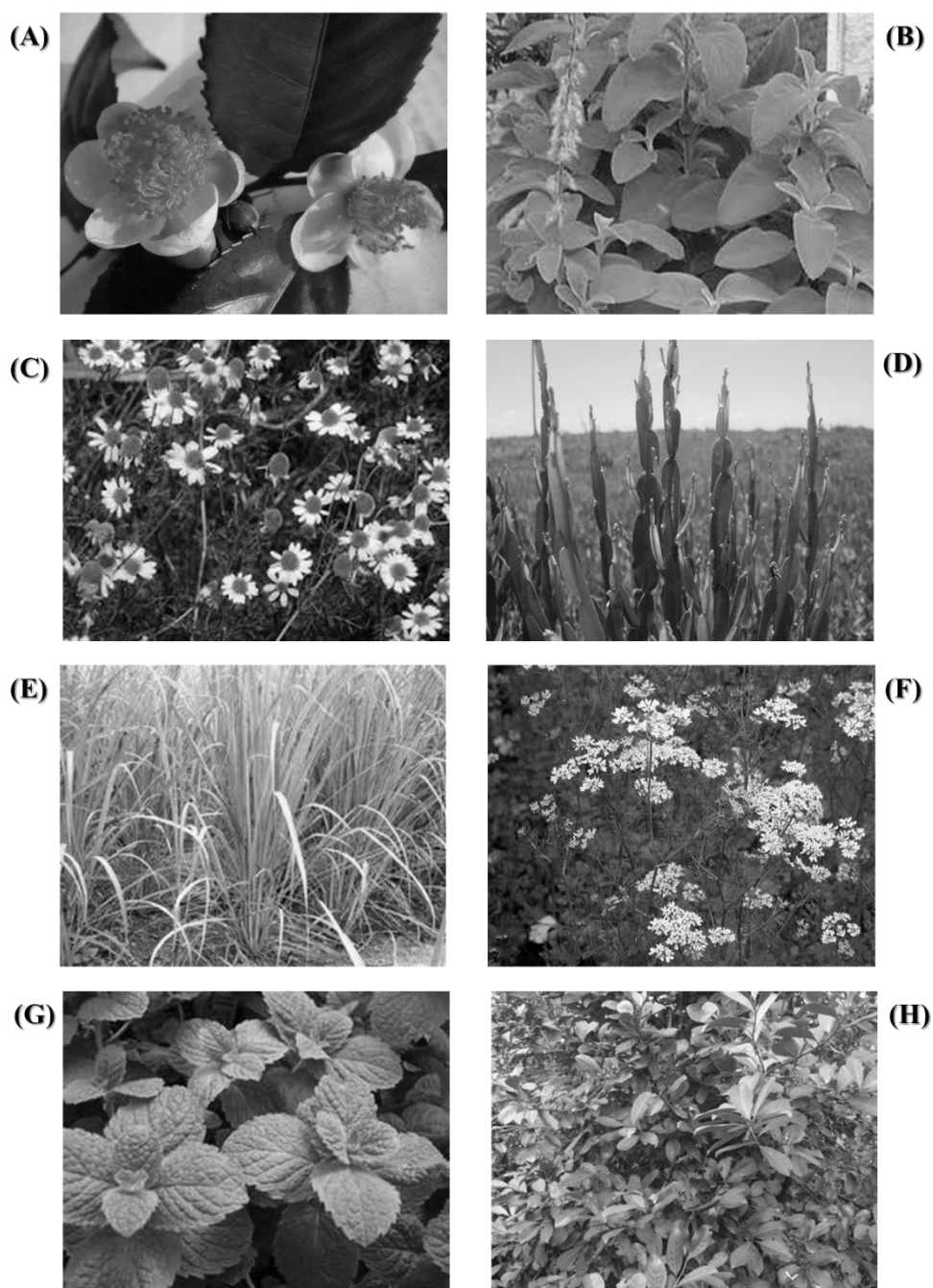
### 1.1 Chás

Os Chás são a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água e vem se tornando um importante produto agrícola. As mais diversas espécies de ervas são usadas como chás no Brasil e no mundo, mas de acordo com a resolução RDC da Anvisa nº 277 de 22 de setembro de 2005 que fixa a identidade e as características mínimas de qualidade os chás devem ser (BRASIL, 2005):

*“O produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor.”*

Em 2013 a produção mundial de chás (*C. sinensis*) foi de aproximadamente de 5,3 milhões de toneladas, com a China sendo o principal produtor com 1,7 milhões de toneladas seguida pela Índia com 1,1 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015). O mercado brasileiro começa a ganhar destaque no consumo de chás, segundo dados da Euromonitor ([www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com)) o consumo no país cresceu 16% em volume, passando a três (3) mil toneladas, entre 2009 e 2011. O avanço do consumo da bebida no Brasil superou a média mundial – de 12% em relação a países como os Estados Unidos onde as altas foram de 7%. De acordocom a Euromonitor, o consumo per capita no Brasil é de apenas 8,5 xícaras - menor volume considerando um *ranking* de 52 países. O primeiro da lista é a Turquia, com 1,6 mil xícaras por pessoa.

Entre as principais espécies de chás de mais expressão de consumo no Brasil destacam-se: *Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita*, e *Ilex paraguariensis* (Figura 1).



**Figura 1.1** Diferentes espécies de ervas consumidas no Brasil como chá. (A) *Camellia sinensis*, (B) *Peumus boldus*, (C) *Matricaria recutita*, (D) *Baccharis trimera*, (E) *Cymbopogon citratus*, (F) *Pimpinella anisum*, (G) *Mentha piperita*, e (H) *Ilex paraguariensis*.  
Fonte: Google imagens.

*C. sinensis* é um arbusto ou árvore de pequeno porte, pertencente à família Theaceae, originária da China, que mais tarde se espalhou pela Índia e Japão, Europa e Rússia, e chegando ao novo Mundo no final do século 17 (DUARTE et al., 2006; SHARANGI, 2009).

Os principais tipos de chás de *C. sinensis* encontrados no mercado brasileiro são denominados de verde, branco, preto, vermelho e amarelo.

*P. boldus* é uma espécie arbórea, pertencente à família Monimiaceae e nativa das regiões central e sul do Chile, onde ocorre abundantemente (RUIZ et al., 2008).

*M. recutita* é uma planta herbácea anual originária do sul e leste da Europa, bem como do oeste asiático, é pertencente à família das Asteraceae. Suas flores são reunidas em capítulo com flores centrais amarelas e as marginais de corola ligulada e tubulosa branca e estas são usadas como chás (SOUZA et al., 2007). Também pertencente à mesma família da *M. recutita* a *B. trimera* apresenta-se como um subarbusto ereto e ramoso. Originária da América do Sul é cultivada principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (RUIZ et al., 2008).

*C. citratus* possui característica herbácea, crescendo em touceiras de aproximadamente 1 m é originária do Sudoeste asiático, pertencente à família Poaceae e distribui-se nas regiões tropicais e subtropicais (MELO et al., 2007).

*P. anisum* é uma planta anual, herbácea, ereta, apresentando flores brancas e dispostas em umbelas, originária de países da Ásia, e da Europa é pertencente à família Apiaceae (TAKAHASHI et al., 2009; TAMBOSI; ROGGE-RENNER, 2010). Sendo suas sementes utilizadas para o preparo de chás.

*M. piperita* pertencente do gênero Lamiaceae originária do continente europeu, é uma erva vivaz ou perene, com caule ramificado, contendo folhas opostas pecioladas ovais e com margem serrilhada, apresentando cor verde mais escura na face superior da folha e mais pálida na inferior (HABER et al., 2005).

*I. paraguariensis* planta da família Aquifoliaceae é originária da América do Sul e caracteriza-se por ser uma espécie arbórea que se desenvolve na região sul do Brasil, no noroeste da Argentina e na parte oriental do Paraguai (DA CROCE, 2002).

As diferentes espécies de ervas que são usadas para a fabricação de chás apresentam diferenças em sua aparência, características organolépticas e conteúdo químico assim como seus aromas devido à respectiva tecnologia de processamento utilizada.

## 1.2 Processo de fabricação dos chás

Os processos de fabricação de chás muitas vezes se assemelham entre as ervas, destacando-se os processamentos mais comuns para os chás de *Camellia sinensis* e de *Ilex paraguensis*.

Na fabricação dos chás de *C. sinensis* os processos se diferenciam, sendo que, para a produção do chá verde as folhas precisam passar por um processo de branqueamento imediatamente após a colheita para a inativação enzimática, que pode ser realizado por tosta ou vaporização, para prevenir a oxidação enzimática das catequinas (WANG et al., 2000). Sem o processo de fermentação, as folhas de chá verde mantêm a sua cor verde e quase todo o seu conteúdo de polifenóis originais (CHAN et al., 2011). Assim como o verde, o chá branco é não fermentado e para sua produção apenas os brotos e as primeiras folhas colhidas são utilizadas sendo secas diretamente, após um processo rápido de quebra das folhas (HILAL, ENGELHARDT, 2007). Outro chá que apresenta características aparecidas ao verde é o amarelo, no qual as condições do processamento para sua preparação são similares. Entretanto, as folhas são postas em um recipiente fechado e sofrem um abafamento (~37°C) por um tempo apropriado, para deixar as folhas amarelas (Figura 2) (YI et al., 2015).

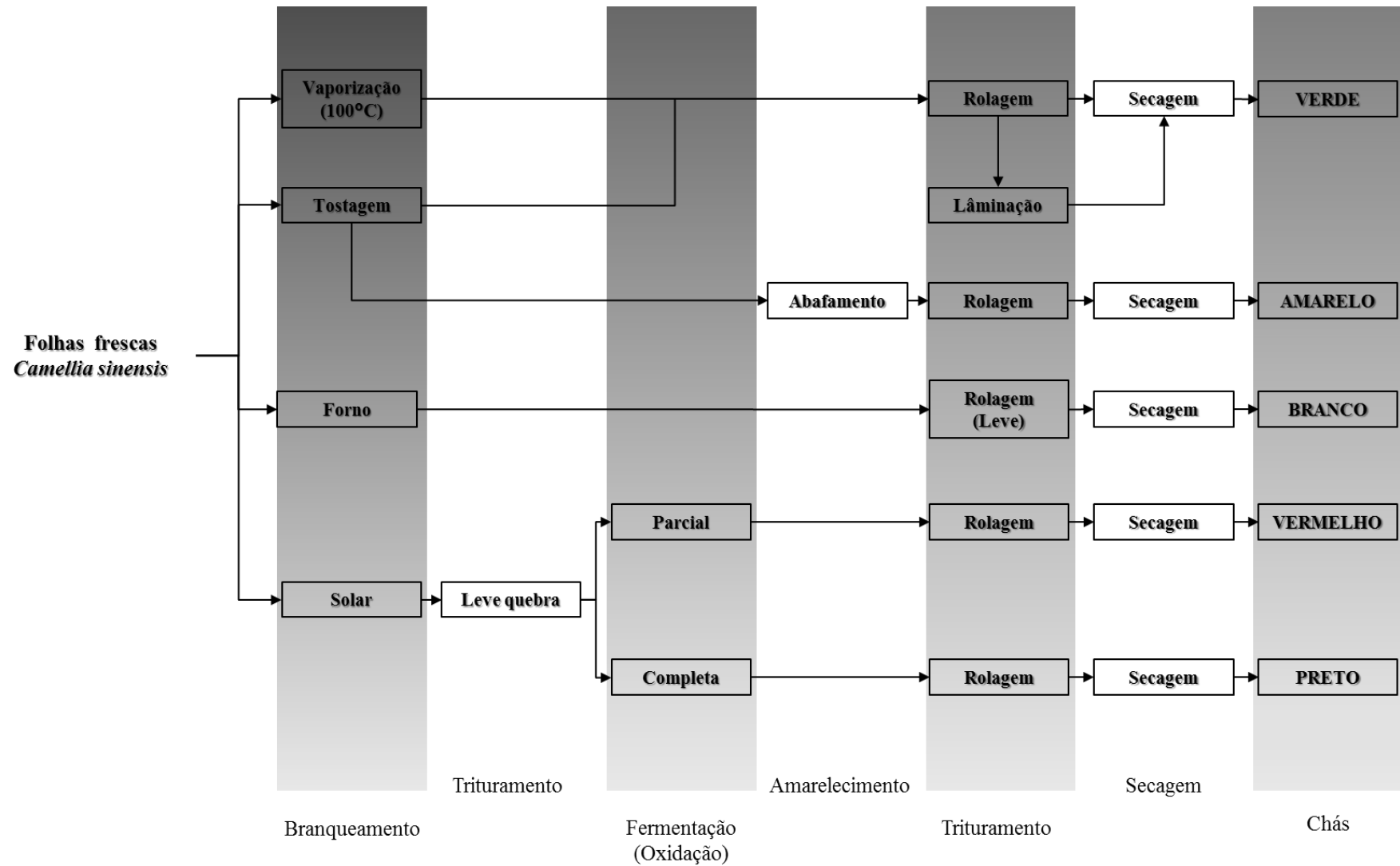
Os chás preto e vermelho diferenciam-se do verde e do branco devido ao processo de oxidação (fermentação) que sofrem. Durante o processamento do chá preto, as folhas frescas são quebradas por laminação ou cortadas antes de serem secas. Então os polifenóis como as catequinas presentes nas folhas dos chás entram em contato com as polifenol oxidases (PFO) que realizam uma oxidação catalítica no processo de fermentação (LIANG; ZHANG; LU, 2005). O preparo do chá vermelho segue todas as etapas do preto, sendo que as folhas após serem quebradas são submetidas a um aquecimento para oxidação pelas PFOs e em seguida submetidas à secagem. O chá vermelho é classificado como um chá semi-fermentado (Figura 2) (WANG; HELLIWELL; YOU, 2000).

No processamento da erva-mate (*I. paraguensis*) as folhas são submetidas a um branqueamento (sapeco), no qual as folhas são expostas diretamente sobre fogo (~600 a 800 °C) em um secador rotatório durante 2 min para deter a oxidação causada pelas enzimas nas folhas, que alteram a cor, sabor e aroma. Então, as folhas são submetidas a uma pré-secagem, e a diferença é a temperatura (280°C/3 min). Na secagem, as folhas são expostas a um fluxo de ar quente até atingirem a umidade de 5%. Este processo demora aproximadamente de 5-8 h. Para o desenvolvimento do sabor o produto seco é envelhecido em câmara de madeira ou cimento de acordo com as características de processamento do processador, e por fim para a

obtenção do chá a erva mate triturada é tostada a 120°C por 15 minutos (HECK; MEIJA, 2007; DE GODOY et al., 2013).

O processamento dos outros tipos de chás, basicamente envolve uma secagem após a sua colheita para a redução da umidade, onde alguns tipos de ervas apresentam alto teor de água no momento da colheita, e com isso requerem uma secagem imediata até níveis próximos de 10% de modo a preservar as suas propriedades originais, evitando a proliferação de microrganismos e reduzir a ação enzimática (BORSATO et al., 2007).





**Figura 1.2** Exemplo do fluxograma do processamento de chás de *C. sinensis*. Adaptado de Heck e Meija (2007) e Yi et al., (2015).

### 1.3 Composição química

Diversos componentes químicos são encontrados nos chás, entre estes incluem os compostos aromáticos, polissacarídeos, aminoácidos, lipídios, vitaminas, elementos inorgânicos (minerais), e principalmente os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) e alcaloides (cafeína, teobromina, etc.) (SHARANGI, 2009).

#### 1.3.1 Chás e seus compostos fenólicos

O interesse nos compostos fenólicos em alimentos e em bebidas está relacionado aos benefícios que estes compostos proporcionam a saúde. As principais classes de compostos fenólicos encontrados em chás são os ácidos fenólicos e os flavonoides. Sendo os representantes dos ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, e dos flavonoides, os flavan-3-óis (catequinas e procianidinas), flavon-3-óis (quercetinas e caempferol), e flavonas. Os outros compostos presentes principalmente em *Camellia sinensis* e *Ilex paraguensis* são os alcaloides (cafeína e teobromina).

As diferenças observadas nos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais encontrados nos chás variam conforme a espécie, clima e solo, tempo de colheita, estágio de desenvolvimento, parte da planta usada, tamanho da partícula, forma e tempo de processo, e o método de extração (GORJANOVIC et al., 2012). Essas diferenças nos teores são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.1** Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais de diferentes espécies de chás.

Espécie	Chá	Fenólicos totais (mg GAE/L)	Flavonoides (mg CAE/L)	Referencia
<i>Camellia sinensis</i>	Verde	759 – 4014	431-1768	Rusak et al. (2008); Chan et al., (2010), Carloni et al., (2013).
<i>Camellia sinensis</i>	Branco	423-3080	218-1786	Rusak et al. (2008); Carloni et al., (2013).
<i>Camellia sinensis</i>	Preto	935-2500	530	Bravo et al., (2007); Ho et al., (2010), Carloni et al., (2013).
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	409	387	Vaquero et al., (2010).
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	102-399	53-95	Aoshima et al, (2007), Chan et al., (2010); Rodrigues et al., (2015).
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja	130-373	135-300	Gião et al., (2007), Rodrigues et al., (2015).
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	97-500	133-195	Aoshima et al, (2007), Ho et al., (2010), Rodrigues et al., (2015).
<i>Pimpinella anisium</i>	Erva-doce	30-77.5		Gulçin et al. (2003).
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã	830-842	761	Chan et al., (2010), Vaquero et al., (2010).
<i>Ilex Paraguensis</i>	Erva-mate	729-925	880	Bravo et al., (2007); Vaquero et al., (2010).

Nota: Fenólicos totais expressos em equivalente de ácido gálico por litro de chá [mg GAE/L] e flavonoides totais expressos em equivalente de catequina por litro de chá [mg CAE/L].

### 1.3.1.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam-se divididos em dois subgrupos: ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóico possuem sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e incluem nesse grupo os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, elágico e siringico (Tabela 2). O outro subgrupo dos ácidos é o dos hidroxicinâmicos que apresentam em sua estrutura nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) sendo os mais comuns que ocorrem naturalmente em sua forma livre os ácidos cafeíco, ferúlico, *p*-coumaríco e *trans*-cinâmico (BRAVO, 1998), ou como uma família de mono ou diesters com ácido (–)-quinico, coletivamente conhecidos como ácidos clorogênicos (MARQUES; FARAH, 2009). Devido à

biossíntese de cada planta há uma variação no tipo e no conteúdo dos ácidos fenólicos presentes em cada uma (Tabela 2).

O efeito biológico dos ácidos fenólicos é devido ao local da ligação, a posição dos grupamentos hidroxil, e o tipo de substituintes no anel aromático (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). A presença de diferentes substituintes na estrutura do fenol modula a sua propriedade antioxidante, em particular a sua capacidade de doar hidrogênio. Em geral, fenóis sem substituição são inativos como doadores de hidrogênio, e monofenóis são menos inativos que polifenóis. A introdução de grupos eletrodoadores tal como grupo hidroxila na posição *orto* ou *para* aumenta a atividade antioxidante do ácido fenólico, assim como a presença de um grupo carboxila e quando este é separado do anel aromático também aumenta. Portanto, ácidos cinâmicos são mais efetivos como antioxidantes que os ácidos benzóicos (GULÇIN, 2012).

Os valores de ácidos fenólicos determinados por Horzic et al. (2009) para infusões de *Camellia sinensis*, tília e camomila variaram de 1,07-37,66 mg/L de ácido gálico (apenas *C. sinensis*), de 0,59-8,89 mg/L de ácido clorogênico (*C. sinensis* e camomila), de 0,63-12,69 mg/L de ácido *p*-coumárico (*C. sinensis* e camomila), de 0,16-14,27 mg/L de ácido cafeíco (tília e camomila), de 3,89-17,32 mg/L de ácido ferúlico (apenas camomila) e de 0,09-14,86 mg/L de ácido vanílico (apenas tília). Na avaliação de compostos fenólicos em diferentes variedades de chás Chineses (verde, preto, oolong), Wu et al. (2012) identificaram além do ácido gálico o ácido 5-galoiquínico presentes em *C. sinensis*.

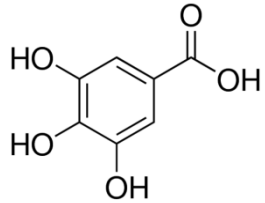
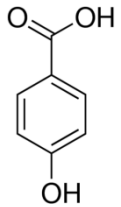
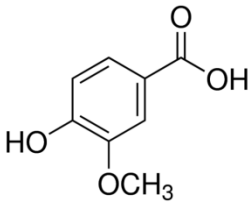
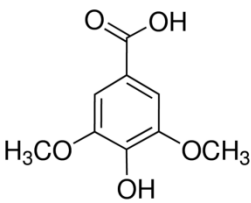
Para infusão de *P. boldus*, Simirgiotis e Hirschmann (2010) realizaram a identificação de constituintes fenólicos e identificaram os ácidos ferúlico, cafeíco, siringico e clorogênicos como os principais. Enquanto que na caracterização de chás de camomila comercializado em diferentes países, Raal et al. (2012) identificaram como os principais os ácidos clorogênico, ferulico glucosideos e dicafeoilquínicos. Os teores de ácido cafeíco, ferulico, e clorogênico encontrados por Proestos et al. (2005) em camomila foram na ordem de 1,2, 1,6, e 2,0 mg/100g, respectivamente.

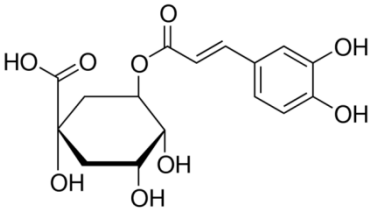
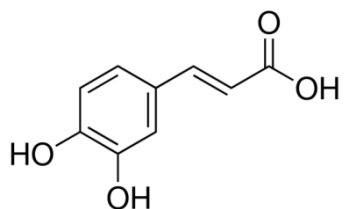
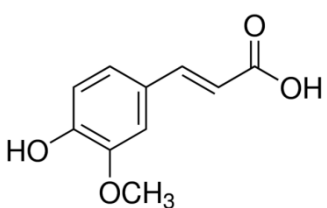
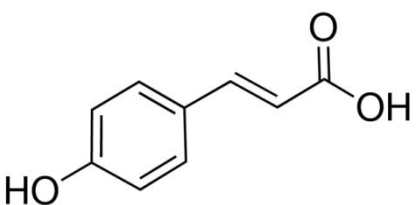
Bravo et al. (2007) caracterizaram por cromatografia líquida acoplado a espectro de massas (LC/MS) as amostras de chás mate comerciais e verificaram que mono-, di-, e tri-esters de ácidos hidroxicinâmicos e ácido quínico os maiores constituintes da fração fenólica de mate. Ácido cafeíco é o principal cinamato, com isômeros de ácidos mono- e dicafeoilquínicos representando mais de 90% do total do conteúdo fenólico. Além disso, Marques e Farah (2009) reportam o alto conteúdo de ácidos clorogênicos também para *I. paraguensis* e para as infusões de *P. anisium*, *C. sinensis* e *C. citratus* com valores entre 84.7

mg a 9.7g/100g. *C. citratus* apresenta também conteúdos de ácidos cafeícos, *p*-coumáricos e ferúlico (FIGUEIRINHA et al., 2008, RODRIGUES et al., 2015). Em *B. trimera* como principal conteúdo fenólico destaca-se os ácidos clorogênicos (ABOY et al., 2012).

De acordo com Riachi e De Maria (2015), *M. piperita* apresenta em sua composição fenólica os ácidos gálico, vanílico, siringico, *p*-coumárico, ferúlico, cafeíco, clorogênico entre outros específicos de sua composição.

**Tabela 1.2** Principais ácidos fenólicos encontrados em chá herbais.

Ácido fenólico	Fórmula molecular	<i>Camellia</i> <i>sinesis</i>	<i>Peumus</i> <i>boldus</i>	<i>Matricaria</i> <i>recutita</i>	<i>Baccharis</i> <i>trimera</i>	<i>Cymbopogon</i> <i>citratus</i>	<i>Pimpinella</i> <i>anisium</i>	<i>Mentha</i> <i>piperita</i>	<i>Ilex</i> <i>paraguensis</i>
Ácido gálico		X						X	
Ácido hidroxibenzóico				X				X	
Ácido vanílico								X	
Ácido siringíco			X		X			X	

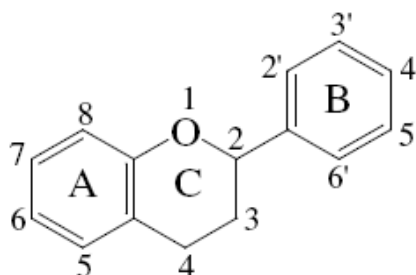
Ácido clorogênico		X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido cafeíco		X	X	X	X	X		X	X
Ácido ferúlico			X	X		X		X	
Ácido <i>p</i> -coumárico		X		X		X		X	

Nota: Adaptado de: Riachi e De Maria (2015), Rodrigues et al., (2015), Raal et al. (2012), Simirgiotis e Hirschmann (2010), Horzic et al. (2009), Marques e Farah (2009), Figueirinha et al., (2008), Heck e Meija (2007), Proestos et al. (2005).

### 1.3.1.2 Flavonóides

As mais diversas funções biológicas têm sido relatadas na literatura para os flavonoides. Porém, isso ocorre devido que estes se mostram como importantes antioxidantes por apresentarem elevado poder redutor, o que lhes permitem atuar como agente redutor, doador de hidrogênio e supressores de oxigênio. Além disso, possuem potencial quelante em metais (TSAO; YANG, 2003).

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular, consistindo de quinze átomos de carbono, arrumados na configuração C6-C3-C6. Essencialmente a estrutura consiste de dois anéis aromáticos, A e B, ligados por uma ligação 3-carbono, usualmente na forma de um anel heterocíclico, C (Figura 3). O anel aromático A é derivado da via acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina por meio da via chiquimato (IGNAT et al., 2011). Entretanto, variações estruturais dentro dos anéis subdividem os flavonoides em diferentes classes (antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis), com as principais encontradas/estudadas em ervas destacam-se os flavanóis e flavonóis. A representação do esqueleto da estrutura química dos flavonóides é apresentada na Figura 2.



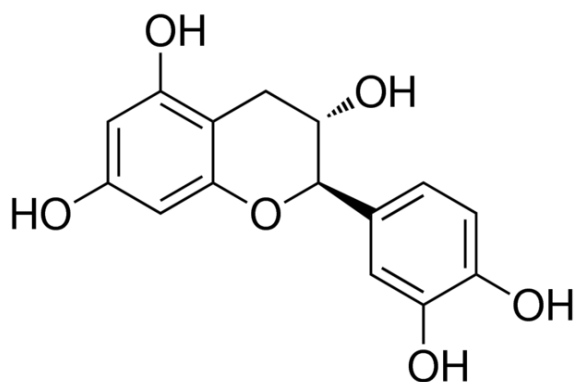
**Figura 1.3** Esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6) dos flavonóides. (A) anel A; (B) anel B e (C) anel C da estrutura da molécula.

#### 1.3.1.2.1 Flavan-3-óis (Flavanóis)

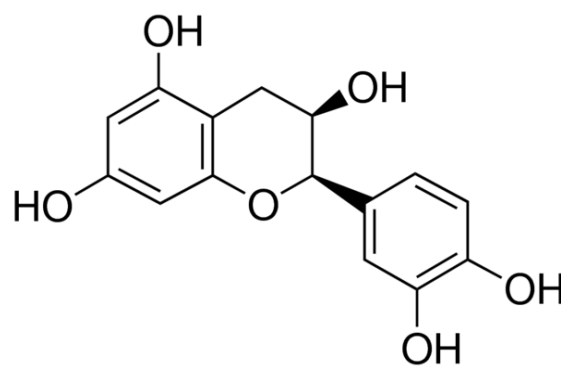
Flavan-3-óis são compostos que apresentam uma hidroxila no carbono 3 do anel C, e ao contrário dos outros flavonóides, geralmente, são encontrados na forma aglicona (SHAHIDI; NACZK, 2004). Nesta classe se fazem presentes as catequinas e as proantocianidinas (Figura 4). A estrutura química dos flavan-3-ols determina a relativa facilidade da atividade oxidativa e eliminação de radicais livres. Embora a presença dos



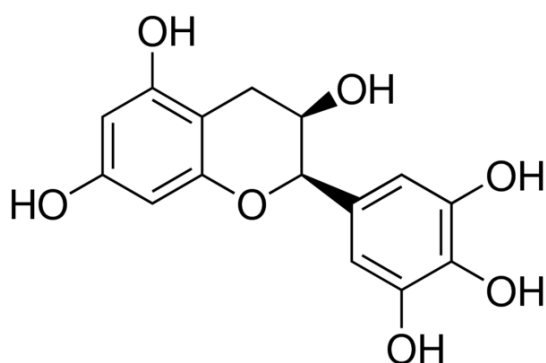
grupos galloyl, número e posição dos grupos hidroxil (baseado no potencial redox) são reorganizados para aumentar a atividade biológica, a metoxilação e glicosilação da posição 3 aparentemente inibi a capacidade de redução (ARON; KENNEDY, 2008).



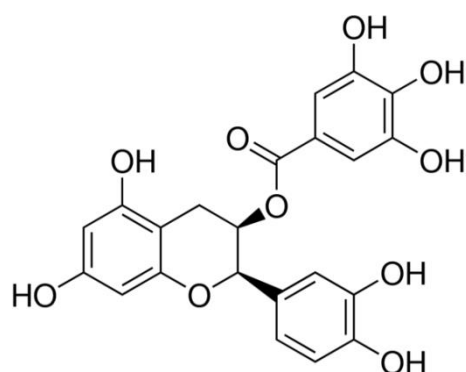
**(+)-Catequina**



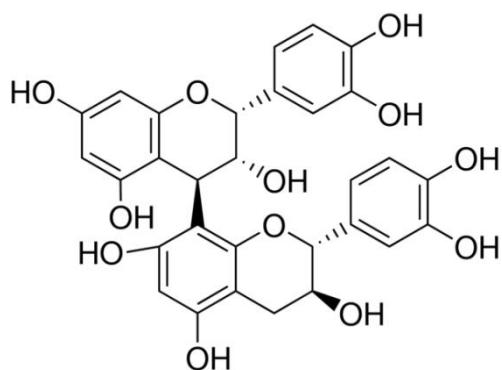
**(-)-Epicatequina**



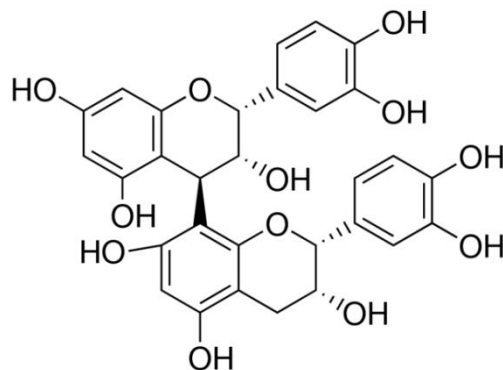
**(-)-Epigallocatequina**



**(-)-Epicatequina galato**



**Procianidina B1**



**Procianidina B2**

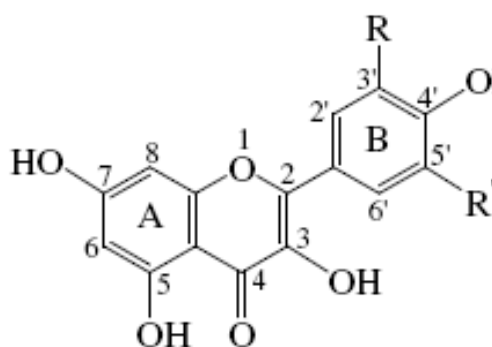
**Figura 1.4** Estrutura de algumas moléculas de flavan-3-óis.

As principais catequinas encontradas em chás de *Camellia sinensis* (verde e branco) são epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), galocatequina (GC), epicatequina (EC) e catequina (C). Entretanto o conteúdo de catequinas nos chás varia com o clima, safra, prática de cultivo, idade da folha e variedade (CHAN; LIM; CHEW, 2007). Além disso, uma variação no conteúdo de catequinas é observada nos diferentes tipos de chás de *C. sinensis* devido à forma de processamento que cada um apresenta. Wang, Helliwell e You (2000) relatam que diferentes chás verdes e pretos consumidos na China, foram ricos em EC, EGC, EGCG e ECG, com o verde apresentando uma quantidade muito maior que o preto de catequinas. Outro estudo realizado Khokhar e Magnusdottir (2002) em chás comumente consumidos no Reino Unido confirma os maiores teores de catequinas nos chás verde em relação ao preto. Os menores conteúdos de flava-3-óis nos chás pretos são devido à oxidação durante a fermentação, no qual ocorre o fenômeno de bioconversão das catequinas pelas polifenol oxidases para dímeros de catequinas (LAMBERT e ELIAS, 2010).

Chás herbais provindos de outras espécies que não sejam *C. sinensis*, apresentam um conteúdo baixo de catequinas, como apresentado por Friedman et al. (2005) na avaliação de 77 chás consumidos no Estados Unidos, no qual verificam que os chás de *C. sinensis* contêm conteúdos elevados de catequinas, enquanto que as infusões herbais uma quantidade muito baixa destes compostos. Na avaliação de flavan-3-óis de diferentes ervas realizada por Yoo, Hwang e Moon (2009) em *C. citratus* foi identificado e quantificado o conteúdo de EGCG e EC, e para *M. piperita* apresentou como constituintes em sua composição EGCG, EGC, e C. Em ambas os maiores conteúdos foram de EGCG. Catequina também apresenta-se em altas concentrações em *Peumus boldus*, assim como esta planta possui conteúdo de procianidinas como seus constituintes (QUEZADA et al., 2004; SIMIRGIOTIS; HIRSCHMANN, 2010).

#### 1.3.1.3 Flavon-3-óis (Flavonóis)

Como sendo o principal subgrupo dos flavanóides, os Flavonóis são caracterizados por uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, um grupo hidroxila na posição-3 e um grupo carbonila na posição-4 do anel-C do núcleo flavan (Figura 5) (KROL et al., 1994). Portanto, as combinações da unidade catecol com a ligação dupla e o grupamento hidroxila proporcionam aos flavonóis a capacidade de eliminação dos radicais livres (VAN ACKER et al., 1996).



Kaempferol (R=R'=H)  
 Quercetina (R=OH, R'=H)  
 Miricetina (R=R'=OH)

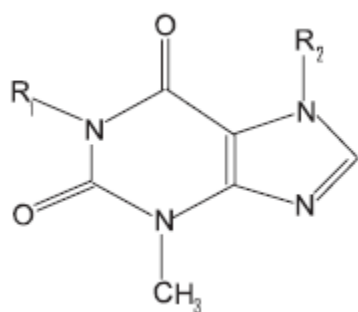
**Figura 1.5** Estrutura dos flavonóis.

Entre os principais flavonóis encontrados nas folhas de chás de *Camellia sinensis* são kaempferol, quercetina e miricetina (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000). Os teores encontrados de flavonóis por Wang e Helliwell (2001) para o chá verde variaram de 0,83-1,59, 1,79-4,05 e 1,56-3,31 g/kg, e no chá preto de 0,24-0,52, 1,04-3,03, e 1,72-2,31 g/kg para miricetina, quercetina e caempferol. Enquanto, que em *I. paraguensis* rutina (quercetin-3-rutinoside), quercetina e caempferol são os flavonóis presentes (HECK; MEIJA, 2007), com valores médios de 23,40, 0,88, 0,27 g/kg, respectivamente (TSAI et al., 2008). Rutina também é relatada por Riachi e De Maria (2015) em *M. piperita* com conteúdo médio de 0,117 g/g.

Porém, a principal forma em que os flavonóis se apresentam é na forma glicosilada, onde também têm sido relatados nos diferentes tipos de chás herbais. Como exemplo têm-se, miricetina-3-*O*-galactosídeo, miricetina-3-*O*-glucosídeo, caempferol-3-*O*-rutinosídeo, caempferol-3-*O*-galactosídeo, caempferol-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-*D*-galactosídeo são exemplos dos compostos que ocorrem na forma glicosilada (CALEJA et al., 2015; WU; HÉRITER; ANDLAUER, 2012; SIMIRGIOTIS; HIRSCHMANN, 2010).

#### 1.3.1.4 Metilxantinas (Alcalóides)

Além dos compostos fenólicos, os chás podem apresentar metilxantinas em sua composição. Por exemplo, *C. sinensis* e *I. paraguensis* são ricos nos teores de metilxantinas, principalmente cafeína, teobromina e teofilina que apresentam em sua estrutura um esqueleto de purina, com diferenciação entre o tipo e posição dos radicais na molécula (MARIA; MOREIRA, 2007) (Figura 6).



Cafeína ( $R_1=R_2=CH_3$ )

Teofilina ( $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ )

Teobromina ( $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ )

**Figura 1.6** Estrutura química das metilxantinas (MARIA; MOREIRA, 2007).

Segundo Khokhar e Magnusdottir (2002) o conteúdo de cafeína de chá preto (22-28 mg/g) foi significativamente maior que o presente no chá verde (11-20 mg/g). Entretanto os resultados encontrados por Kazimierczak et al. (2015) o conteúdo de cafeína de chás verdes de produção convencional e orgânicos variaram de 11.18 a 26.10 mg/g. Em chás branco e verde têm também sido encontrado diferentes quantidades de teobromina e teofilina (UNACHUKWU et al., 2010).

O conteúdo de cafeína e teobromina encontrados em *I. paraguensis* cultivadas na região do Paraná foram de 5,59 e 1,88 mg/g, respectivamente, totalizando 7,47 mg/g de metilxantinas totais (BERTÉ et al., 2011). Enquanto, que os resultados de Schubert et al. (2006) mostraram uma variação anual de metilxantinas totais em amostras do estado do Rio Grande do Sul com o conteúdo variando de 1,77 até 10,37 mg/g. Enquanto, que na avaliação da extração a quente e a frio de diferentes chás herbais, Rodrigues et al., (2015) determinaram valores de cafeína em *B. trimera* variando de 39.74-47.35 mg/L.

#### 1.4 Benefícios à saúde

A presença dos compostos bioativos em chás está correlacionado aos efeitos benéficos. Entre os efeitos mais relatados na literatura inclui a atividade antioxidante das ervas utilizadas no preparo dos chás. Moraes et al. (2009) verificaram a atividade antioxidante *in vitro* de chás e condimentos de grande consumo no Brasil, entre as ervas utilizadas para chás *P. boldus*, *M. recutita*, *C. citratus*, *B. trimera*, e *C. sinensis* (fermentado e não-fermentado) foram avaliados. Entre todos os chás analisados *C. sinensis* apresentou a maior atividade contra o sequestro de radicais livres (método do DPPH). Leenen et al. (2000) investigaram o efeito do consumo de chá preto e verde na atividade antioxidante no plasma de 21 voluntários saudáveis, e foi verificado um aumento significativo na atividade antioxidante,

atingindo níveis máximos depois de 60 min de consumo, com o maior aumento observado para o consumo de chá verde.

Em busca de novas aplicações na indústria de alimentos, os chás também podem ser utilizados como conservantes antimicrobianos naturais. Em seu estudo Oh et al. (2013) verificaram que o chá verde teve potencial antimicrobiano contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, e *S. entérica*. Entretanto, o chá mate foi mais positivo contra as bactérias gram-positivas. Enquanto que, Tsai et al. (2008) apresentou que extratos de onze diferentes ervas podem ter também atividade microbiana contra bactérias cariogênicas (*S. mutans* e *S. sanguinis*).

Entre os outros efeitos benéficos a saúde pode-se relatar que os chás proporcionam: efeitos antimutagênicos (BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005), anticâncer e antiapoptótica (CAI et al., 2004; EL-BESHBISHY et al., 2011), neuroprotetiva (MENDEL; YODIM, 2004), hiperglicêmico e anti-hiperglicêmico (ABEYWICKRAMA; RATNASOORIYA; AMARAKOON, 2011), anti-inflamatórios (CHAUDHURI et al., 2005), e anti-hipertensão (RANILLA et al., 2013). Estas atividades biológicas estão associadas em parte a atividade antioxidante dos compostos químicos presentes nos chás, principalmente os flavonóides.

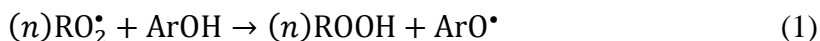
### 1.5 Métodos químicos de atividade antioxidante *in vitro*

No contexto, tem-se sugerido um aumento no consumo de uma dieta rica em antioxidantes para redução dos riscos à saúde. Assim, uma atenção vem sendo dada à capacidade antioxidante dos produtos naturais, principalmente os de principal consumo pelas pessoas (LÓPES-ALARCÓN; DENICOLA, 2012). Nos últimos anos, uma grande quantidade de métodos espectrofotométricos tem sido adotados para medir os níveis de atividade antioxidantes *in vitro*. Entre os mais comuns encontrados na literatura para a determinação da atividade antioxidante em chás destaca-se o DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS ((2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)), FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro), CUPRAC (capacidade antioxidante de redução do cobre) e ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio).

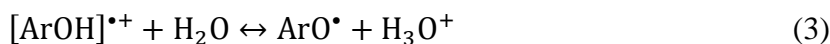
A maioria dos métodos empregados apresenta o mesmo princípio, onde um radical colorido sintético é empregado e/ou um composto redox-ativo é gerado, e a habilidade da amostra biológica de eliminar o radical ou reduzir o composto redox-ativo é monitorado por espectrofotômetro (UV-Vis-Fluorescência), e assim para a quantificação da atividade antioxidante pode ser usado um padrão apropriado, por exemplo, trolox e assim, os resultados

serão expressos em equivalente massa de trolox (FLOEGEL et al., 2011). Além disso, os métodos podem ser divididos pelos diferentes mecanismos que são: transferência do átomo de hidrogênio (TAH), transferência simples de elétrons (TSE) e/ou a mistura entre TAH e TSE (CRAFT et al., 2012).

O mecanismo de transferência do átomo de hidrogênio funciona quando o extrato vegetal com propriedade antioxidante inibirá o radical livre através da doação dos átomos de hidrogênio e tornando mais estável o radical livre (Equação 1) (CRAFT et al., 2012). Portanto, o teste ORAC avalia a função do composto antioxidante tem em inibir o consumo da molécula alvo mediante o radical peroxil (por exemplo, AAPH) (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Nesta medida a capacidade antioxidante é avaliada pela área sob a curva (AUC) do perfil cinético do consumo da molécula alvo.



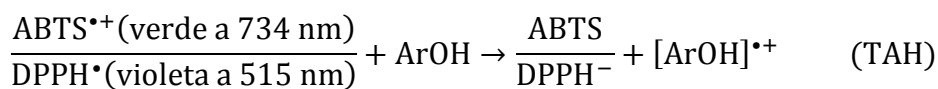
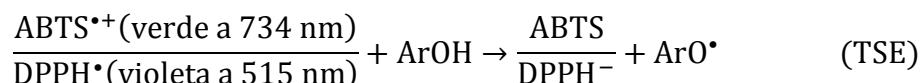
Outro possível mecanismo que pelo qual um composto antioxidante pode desativar um radical livre é pela transferência de elétrons, no qual o antioxidante transfere um simples elétron para o ROS (*Reactive oxygen specie*). Então, o radical catiônico resultante é desprotonado pela interação com a água e o resultado final da reação é o mesmo de uma reação de transferência do átomo de hidrogênio em termos na eliminação de radicais, portanto se o  $[ArOH]^{\bullet+}$  se mantiver estável pode agir em determinados extratos (WRIGHT; JOHNSON; DILABIO, 2001).



FRAP e CUPRAC são exemplos de métodos de transferência de elétrons, no qual se objetiva avaliar a capacidade da amostra na transferência de elétrons dos íons de ferro e cobre em um meio aquoso, respectivamente. O reativo de FRAP usa a reação do complexo ferro com tripiridil triazina ( $Fe^{III}$ -TPTZ) com os antioxidantes (BENZIE; STRAIN, 1996), enquanto que o CUPRAC determina a habilidade da amostra reduzir o complexo cobre-neocuproina ( $Cu^{II}$ -Nc) (APAK et al., 2007). O método por FRAP mostra algumas desvantagens, como o fato que o método requer um meio ácido (pH 3,6), que é distante do pH fisiológico e apresenta uma reação incompleta com polifenóis, enquanto para o CUPRAC a

reação é completa para a maioria dos flavonoides e é conduzida a pH 7,0, ou seja melhor simulada nas condições fisiológicas (APAK et al., 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Como a maioria das reações antioxidantes são caracterizadas seguindo os processos químicos de transferência do átomo de hidrogênio (TAH) ou transferência simples de elétrons (TSE), estes mecanismos de reação podem, e fazem, ocorrer simultaneamente (CRAFT et al., 2012). DPPH e ABTS são dois radicais livres estáveis e coloridos que podem apresentar esse mecanismo. No qual a solução reativa misturada com o extrato vegetal pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um simples elétron, e a forma reduzida do radical é gerada seguindo pela perda de cor (ALI et al., 2008). A seguir é mostrado o esquema das reações entre ABTS e DPPH para ambos os mecanismos:



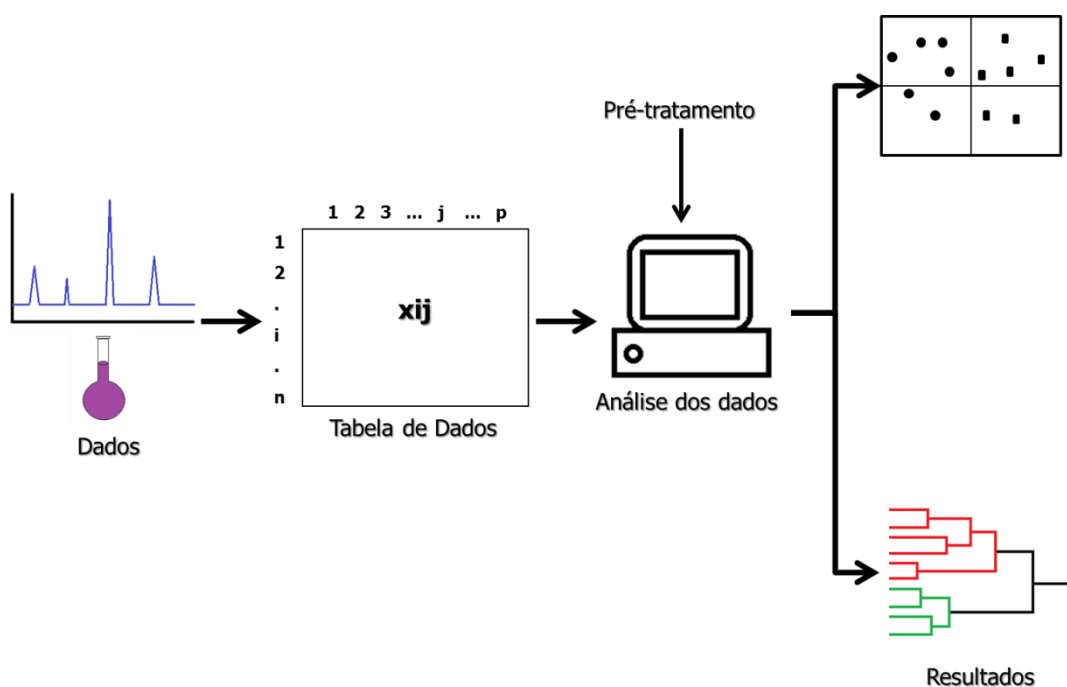
## 1.6 Quimiometria aplicada no estudo na ciência e tecnologia de alimentos

Com o avanço da tecnologia no passar dos anos, novas técnicas analíticas tem sido desenvolvidas e o número de variáveis e pontos de dados coletados em uma análise cresceram muito. Assim, abordagens de análises unidimensionais não são tão adequadas para explorar os dados, uma vez que não garantem a determinação da associação entre os dados experimentais e obter informações sobre as características intrínsecas das matrizes alimentares complexas. A fim de ultrapassar esta limitação, métodos quimiométricos são reconhecidos como uma valiosa ferramenta em Ciência e Tecnologia de Alimentos de maneira a explorar os dados com todas as variáveis/amostras em conjunto (ZIELINSKI et al., 2014).

### 1.6.1 Análise Multivariada

O controle de qualidade de alimentos por técnicas estatísticas multivariada tem aumentado em muitos campos da engenharia, ciência e tecnologia de alimentos uma vez que estas ferramentas são capazes de extrair uma quantidade máxima de informação de dados

químicos e instrumentais (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2012). Entre as técnicas multivariadas podem ser descritas as análises de caráter não supervisionado: análise de componente principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e entre as análises de caráter supervisionado pode-se citar a análise discriminante linear (LDA). Nestas análises e nas outras de carácter multivariado, em primeiro momento há a coleta dos dados que podem ser adquiridos de diversas técnicas analíticas tal como aceitação sensorial, propriedades reológicas, conteúdo de vitaminas, compostos fenólicos, minerais essenciais, carotenoides, e bioatividade junto com microrganismos e radicais livres, espectros, entre outros. Em seguida, uma importante e decisiva etapa para realização das análises é a organização dos resultados experimentais, onde a matriz deve ser definida e estruturada antes do uso do software (ZIELINSKI et al., 2014). Em geral, uma transformação dos dados na tabela é requerida para fazer sua distribuição simétrica e dar cada variável resposta (coluna) o mesmo peso e a mesma importância na análise (WOLD et al., 2001). Se o pré-processamento dos dados não for realizado propriamente, deve ocorrer uma extra variação no conjunto de dados (ENGEL et al., 2013). Por fim, com o adequado software estatístico escolhido pelo analista os diferentes métodos multivariados podem ser realizados (Figura 7). A Tabela 3 apresenta alguns exemplos do uso das técnicas multivariadas por diferentes autores na avaliação de chás.



**Figura 1.7** Esquema geral do processo da análise multivariada de dados.



### 1.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) representa uma das técnicas multivariada mais usada, principalmente devido a suas atrativas características, tal como a geração de gráfico 2D e 3D que facilita o entendimento da similaridade e diferença entre as amostras. PCA é uma técnica não supervisionada que reduz a dimensionalidade da matriz dos dados originais em um novo sistema de eixos (componentes principais), retendo a quantidade máxima de variabilidade (percentagem da variância explicada), e permite a visualização do arranjo original das amostras em um espaço n-dimensional (usualmente duas ou três dimensões) para identificar as direções nas quais a maior parte da variância está retida (ZIELINSKI et al., 2014). Matematicamente, na análise, a matriz denominada  $\mathbf{X}$  (matriz com os dados) é decomposta em um produto de duas matrizes  $\mathbf{T}$  (escores) e  $\mathbf{P}$  (pesos), e mais uma  $\mathbf{E}$  (erros) (SOUZA; POPPI, 2012), como é apresentado na Equação 5:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

Os escores representam as coordenadas das amostras no gráfico de dispersão formado pelas componentes principais. No qual, cada componente principal (PC) é formada pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os PCs, representando o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A primeira PC (PC1) é traçada no sentido da maior variação do conjunto de dados, a segunda (PC2) ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior percentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante (SOUZA; POPPI, 2012). Portanto, os escores representam as relações de similaridade entre as amostras e a avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para o agrupamento observado no gráfico dos escores.

### 1.6.1.2 Análise hierárquica de agrupamentos

Outro método de caráter não supervisionado é a análise de agrupamentos hierárquica (HCA), que é um procedimento de classificação que envolve um conjunto de métodos estatísticos que apresentam similaridade ou mostram características similares. O pressuposto inicial é que a proximidade dos objetos no espaço definido pelas variáveis reflete a

similaridade das suas propriedades (GIACOMINO et al., 2011). Tipicamente, no método de agrupamentos, todas as amostras dentro de um grupo (*cluster*) são consideradas apresentando características similares. O primeiro objetivo da HCA é mostrar os dados de tal maneira que os grupos naturais e padrões possam ser mostrados em um espaço 2D (também chamado dendrograma). Esta representação gráfica permite a visualização dos grupos e correlações entre qualquer amostra ou variáveis simultaneamente, a qual é uma importante vantagem positiva sobre os métodos univariados (CRUZ et al., 2011).

Portanto, como a primeira etapa na HCA é avaliar a similaridade (ou dissimilaridade) que é a distancia ou coeficiente de correlação usado para medida da (dis)similaridade, um dos métodos usados pode ser através da distância Euclidiana (GIACOMINO et al., 2011). Em geral, considera-se  $p$  variáveis  $X_1, X_2, \dots, X_p$  medidas em uma amostra  $n$  e os dados observados para entre dois objetos  $i$  e  $j$  podem ser denotados por  $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip}$  e  $x_{j1}, x_{j2}, \dots, x_{jp}$ . Assim a distância Euclidiana entre estes dois objetos é dado pela Eq. (6) (CORNISH, 2007):

$$d_{ij} = \sqrt{(x_{i1} - x_{j1})^2 + (x_{i2} - x_{j2})^2 + \dots + (x_{ip} - x_{jp})^2} \quad (6)$$

O segundo passo é agrupar os dados, e para isso uma série de diferentes métodos (algoritmos) podem ser usados. Os mais populares métodos são baseados na matrix de similaridade, onde os dois objetos mais similares (por exemplo **a** e **b**) são identificados e substituídos com um novo objeto combinado **c**. Então, a similaridade entre o objeto **c** e cada um dos objetos restantes é calculada com procedimentos diferentes (GIACOMINO et al., 2011). Os principais são: *single linkage method*, *complete linkage method*, *average linkage method*, *centroid method* e *Ward's method* (MOOI; SARSTEDT, 2011).

#### 1.6.1.3 Análise Linear Discriminante (LDA)

A análise linear discriminante (LDA) é uma técnica estatística supervisionada usada para encontrar combinações lineares que caracteriza ou separa duas ou mais classes de objetos (ZIELINSKI et al., 2014). A análise é baseada no cálculo das novas variáveis, chamadas funções discriminantes, obtidas de combinações lineares das variáveis originais. Estas combinações lineares são derivadas, de modo que a melhor indica as diferenças entre as classes e em contrapartida com a variação dentro das classes (GIACOMINO et al., 2011). Portanto, a LDA está intimamente relacionada à análise de variância e a análise de regressão

linear, e tenta expressar uma variável dependente como uma combinação linear de outras características ou medidas. A denotação matemática usada para a classificação correta das amostras é dada pela aplicação da Eq. (7):

$$S_i (\%) = c_i + w_{i1} * x_1 + w_{i2} * x_2 + \dots + w_{im} * x_m \quad (7)$$

onde o subscrito  $i$  denota o respectivo grupo, o subscrito 1, 2,..., e  $m$  denota as  $m$  variáveis;  $c_i$  é uma contante para o  $i$ -ésimo grupo,  $w_{ij}$  é o peso para  $j$ -ésima variável na computação da escore de classificação para o  $i$ -ésimo grupo,  $x_j$  é o valor observado para os respectivos casos para a variável  $j$ -ésima e  $S_i$  é o escore de classificação resultante, dado em porcentagem (GRANATO et al., 2014).

#### 1.6.2 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A metodologia de superfície de resposta (RSM) tem importantes aplicações no planejamento, desenvolvimento e formulação de novos produtos e além de ser usada para a otimização de um processo (ex: extração) (BAS; BOYACI, 2007). Através da análise é possível avaliar os efeitos das variáveis (fatores independentes) e suas interações, ao passo que a metodologia experimental gera um modelo matemático que descreve o processo (BASSANI; NUNES; GRANATO, 2014). Entretanto, antes da aplicação da RSM é necessária à escolha de um planejamento experimental para a realização dos experimentos, e para isto, diversos tipos têm sido usados como, por exemplo, planejamento experimental de Box-Behnken e de misturas (simplex-centróide).

O planejamento de Box-Behnker é uma classe de planejamento de segunda ordem baseado no planejamento fatorial incompleto com três níveis. O número de experimentos requerido para o desenvolvido é definido como  $N = 2k(k - 1) + C_0$ , (onde  $k$  é o número de fatores e  $C_0$  é o número de pontos centrais) (FERREIRA et al., 2007). O Box-Behnker, é ligeiramente mais eficiente que o composto central e muito mais eficiente que o fatorial completo com três níveis onde a eficiência do planejamento é definida com o número de coeficiente no modelo estimado dividido pelo número de experimentos (FERREIRA et al., 2007).

Outra classe é o planejamento de misturas (simplex-centroide). Este envolve o uso de diferentes combinações entre os componentes (fatores) por mudanças das composições das

misturas e explorar como tais mudanças tem um efeito nas respostas específicas (LONNI et al., 2012).

**Tabela 1.3** Exemplos do uso de métodos estatísticos multivariados aplicados na avaliação de chás e infusões herbais.

Amostras	Avaliação analítica	Aplicação estatística	Objetivo	Referência
17 chás herbais consumidos na Turquia.	Minerais.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA</li> <li>• HCA</li> <li>• LDA</li> </ul>	Classificar os chás herbais relacionados ao conteúdo de minerais.	Kara (2009).
18 chás herbais consumidos na Tailândia.	Compostos fenólicos, atividade antioxidante, ação antiglicante.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA</li> <li>• HCA</li> </ul>	Correlacionar e verificar a similaridade entre as amostras	Deetae et al. (2012)
74 amostras de chás ( <i>C. sinensis</i> )	Compostos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA</li> <li>• HCA</li> </ul>	Distinguir e classificar as amostras relacionadas ao processo.	Yi et al. (2015)
54 amostras de chás ( <i>C. sinensis</i> )	Compostos voláteis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA</li> </ul>	Distinguir o tipo de chás	Qin et al. (2013)

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE DIFERENTES CHÁS BRASILEIROS USANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS**

O conteúdo desse capítulo foi publicado na revista Food Research International (Anexo I)

## ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE DIFERENTES CHÁS BRASILEIROS USANDO TÉCNICAS ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS

### RESUMO

Um total de 51 chás brasileiros das espécies *Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita* e *Ilex paraguariensis* foram analisados em termos de compostos fenólicos, cor e capacidade antioxidante *in vitro*, usando os métodos de FRAP e DPPH. Os dados foram analisados usando análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise discriminante linear (LDA). Correlações significativas ( $P < 0,01$ ) foram obtidas entre atividade antioxidante medida por DPPH e FRAP com os compostos fenólicos totais ( $r = 0,87$ ;  $r = 0,90$ , respectivamente) e flavonoides totais ( $r = 0,79$ ;  $r = 0,77$ , respectivamente). Os compostos que mostraram correlações significativas ( $P < 0,05$ ) com a atividade antioxidante foram ácido gálico, catequina, epicatequina, procianidina B2, quercitrina e cafeína. A PCA foi capaz de checar a similaridade entre as amostras de chás, explicando 50% da variabilidade dos dados. Quatro grupos foram sugeridos pela HCA, no qual o Cluster 3 mostrou os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante, ácido gálico e cafeína. Todas as amostras incluídas neste grupo foram de *Camellia sinensis*. A capacidade de classificação obtida pela LDA foi de 82,00%, com 100 % das amostras de *I. paraguariensis*, *C. citratus*, *M. recutita* e *P. boldus* corretamente classificadas, enquanto que 60 % dos chás de *P. anisum*, 80% dos de *M. piperita* e 88,24 % dos de *C. sinensis* foram corretamente classificados.

**Palavras-chave:** estatística multivariada, análise exploratória, controle de qualidade, análise discriminante, flavonoides.

## 1 INTRODUÇÃO

Os chás são a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água, e tem ganhado muita atenção devido aos seus benefícios de promover a saúde, que incluem: os efeitos antimutagênico (BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005), anticâncer e anti-apotótico (CAI et al., 2004; EL-BESHBISHY et al., 2011), neuroprotetivo (MENDEL e YODIM, 2004), hipoglicêmico e antihiperglicêmico (ABEYWICKRAMA; RATNASOORIYA; AMARAKOON, 2011), antioxidante (MORAIS et al., 2009), antimicrobiano (OH et al., 2013), e anti-inflamatório (CHAUDHURI et al., 2005). Estas atividades biológicas estão associadas em parte a atividade antioxidante dos compostos químicos presentes em chás, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos. Assim, a avaliação da quantificação total e individual dos compostos fenólicos é essencial para correlacionar a estes efeitos biológicos.

A caracterização da capacidade antioxidante dos chás é importante para determinar os seus benefícios à saúde. Vaquero et al. (2010) avaliaram a associação entre a atividade antioxidante (FRAP e DPPH) e o conteúdo de compostos fenólicos totais de infusões de chás herbais consumidos na Argentina e observaram altas correlações ( $r > 0,81$ ,  $P < 0,05$ ). Katalinic, Milos, Jukic (2006) realizaram um *screening* de 70 extratos de plantas medicinais e verificaram uma alta correlação entre a capacidade antioxidante medida por FRAP e os compostos fenólicos totais ( $r = 0,98$ ,  $P < 0,001$ ). Neste sentido, a efetividade da atividade antioxidante depende da espécie de chá, do conteúdo e do tipo de compostos fenólicos presentes em cada espécie. Atoui et al. (2005) e Bravo, Goyaa, Lecumberria (2007) verificaram que os ácidos fenólicos e seus derivados foram detectados em todas as infusões herbais enquanto que a presença de flavonoides variou consideravelmente: catequinas foram encontradas presentes principalmente em *Camellia sinensis*. Portanto, é importante monitorar a composição fenólica e a atividade biológica dos chás consumidos por grande parte da população de maneira a correlacionar seus benefícios com a saúde humana.

O controle de qualidade de alimentos por técnicas estatísticas multivariadas (quimiometria) tem aumentado em muitos campos da ciência e tecnologia de alimentos uma vez que estas ferramentas são capazes de extrair a quantidade máxima de informação dos dados químicos, incluindo composição química e atividade antioxidante de extratos vegetais (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2012; HOSSAIN et al., 2011; PATRAS et al., 2011). Em relação aos chás comerciais, é importante realizar pesquisas que assegurem sua composição química e bioatividade, especialmente a capacidade antioxidante, uma vez que os consumidores não tem acesso a estes dados. Assim, considerando que os chás são capazes de aumentar a capacidade antioxidante no plasma humano e em múltiplos órgãos (BENZIE et al.,



1999, FREI e HIGDON, 2003), a avaliação de tais produtos é importante para providenciar informação sobre suas possibilidades aos benefícios à saúde. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante *in vitro* de diferentes variedades de chás amplamente comercializados e consumidos no Brasil usando três diferentes técnicas estatísticas multivariadas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido *p*-coumárico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina, quercitrina, e cafeína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, acetonitrila e ácido acético foram de grau HPLC, enquanto que os outros reagentes usados no experimento foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas usando água ultra pura (Milli-Q).

### 2.2 Amostras de chás

Um total de 51 amostras de chás em saquinhos foi adquirido no comércio de Ponta Grossa, Brasil: *Camellia sinensis* (n = 18), *Peumus boldus* (n = 5), *Matricaria recutita* (n = 5), *Baccharis trimera* (n = 4), *Cymbopogon citratus* (n = 5), *Pimpinella anisum* (n = 5), *Mentha piperita* (n = 5), *Ilex paraguariensis* (n = 4). Vale ressaltar que no Brasil, apenas duas marcas compartilham mais que 60% do total das vendas, e as amostras avaliadas neste estudo representam bem todos os chás comercializados em todo o país.

### 2.3 Procedimento de extração

Inicialmente, 30 g de cada amostra foi misturada e homogeneizada por constante agitação (150 rpm). Então, um total de 2,0 g de cada amostra foi extraído com 100 mL de água destilada a 80°C em um frasco de vidro coberto com uma tampa de maneira a evitar a evaporação. O procedimento de extração foi conduzido à agitação constante por um período de 7,5 minutos. Então, a mistura foi filtrada e os chás foram transferidos para tubos Falcon e imediatamente congelados a - 20°C até o momento das análises.

## 2.4 Compostos fenólicos totais (TPC)

Os TPC das amostras de chás foram determinados pela análise colorimétrica usando o reagente de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton e Rossi (1965). Em um tubo de ensaio, 8,4 mL de água destilada, 100  $\mu$ L da amostra diluída (1:7) e 500  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados. Depois de 3 min, 1,0 mL do carbonato de sódio foi adicionado em cada tubo e o tubo foi agitado por 10 segundos em um vortex. Depois de 1 hora, a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 725 nm. A medida foi comparada com uma curva de calibração de ácido gálico [concentração de fenólicos totais =  $497,52 \times$  absorbância;  $R^2 = 0,998$ ;  $P < 0,001$ ] e os resultados foram expressos como miligrama de equivalente de ácido gálico (GAE) por litro de chá [mg GAE/L].

## 2.5 Determinação do conteúdo de flavonóides totais (TFC)

Os TFC foram quantificados em triplicata pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (JIA; TANG; WU, 1999). Resumidamente, 250  $\mu$ L da amostra diluída de chá (1:3) foi misturada com 2720  $\mu$ L de uma solução etanólica (30%) e 120  $\mu$ L de nitrito de sódio. Esta solução foi misturada bem e deixado reagir por 5 min e então 120  $\mu$ L de uma solução de cloreto de alumínio (10%) foi adicionado nos tubos de ensaio e deixado reagir por mais 5 min. Então, 800  $\mu$ L de uma solução de NaOH (1 mol/L) foi adicionado nos tubos e a absorbância foi medida contra um reagente branco (etanol) a um comprimento de onda de 510 nm usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão). As medidas foram comparadas por uma curva de calibração de catequina (CT) [concentração de flavonoides =  $434,78 \times$  absorbância;  $R^2 = 0,999$ ;  $P < 0,001$ ] e os resultados foram expressos como miligrama de equivalentes de catequina (CTE) por litro de chá [mg CTE/L].

## 2.6 Medida da atividade antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante total das amostras de chás foi determinado em triplicata usando método de redução do ferro (FRAP) de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. A medida é baseada no poder de redução dos antioxidantes presentes nos chás, no qual um potencial antioxidante reduz o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), formando um complexo azul ( $\text{Fe}^{2+}$ /TPTZ), no qual aumenta a absorção a 593 nm. Resumidamente, o reagente de FRAP foi preparado pela mistura do tampão acetato (300 mM, pH 3,6), com uma solução de 10 mM TPTZ em 40 mM HCl, e 20 mM  $\text{FeCl}_3$  na proporção de 10:1:1 (v/v/v). O reagente de FRAP recém-preparado (300  $\mu$ L) e

as amostras de chás diluídas (10 µL) foram adicionados para cada placa e misturados vagarosamente por 10 segundos. As medidas foram realizadas usando uma microplacas (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, EUA), e a absorbância foi medida a 593 nm depois de 30 min. Uma curva padrão [FRAP = 462,96 x absorbância;  $R^2 = 0,999$ ;  $P < 0,001$ ] foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000 µmol/L). Os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox por litro de chá (µmol TE/L). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A habilidade dos chás na eliminação dos radicais livres foi determinada em triplicata pelo método DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995), com mínimas modificações. Este método consiste em determinar a capacidade de doar hidrogênio das moléculas e não produzir reações de oxidação em cadeia ou reagir com radicais livres intermediários. As amostras diluídas (1:10) foram adicionadas (100 µL) para 3,9 mL de uma solução metanólica de 125 µmol/L. A absorbância de 517 nm foi medida usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão) depois que a solução foi deixada em repouso no escuro por 30 min. Metanol foi usado com um controle negativo (branco). A atividade de eliminação dos radicais livres de cada amostra de chá foi calculada usando a equação 1:

$$\text{Atividade antioxidante (\% inibição)} = [1 - (\text{Abs}_{517\text{amostra}}/\text{Abs}_{517\text{branco}})] \times 100 \quad (1)$$

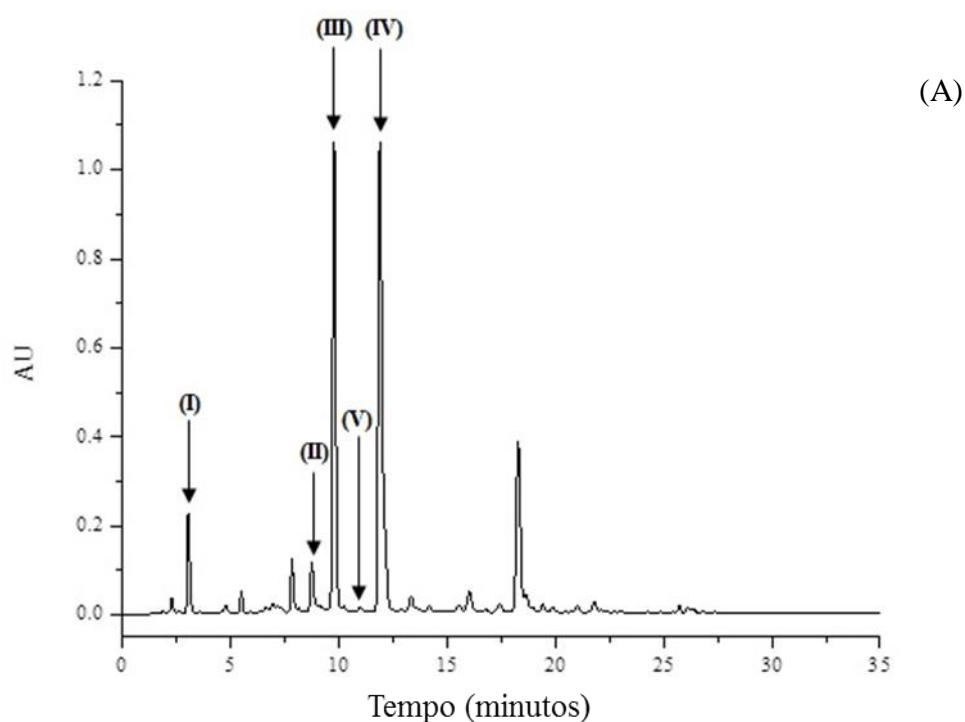
## 2.7 Atributos de cor

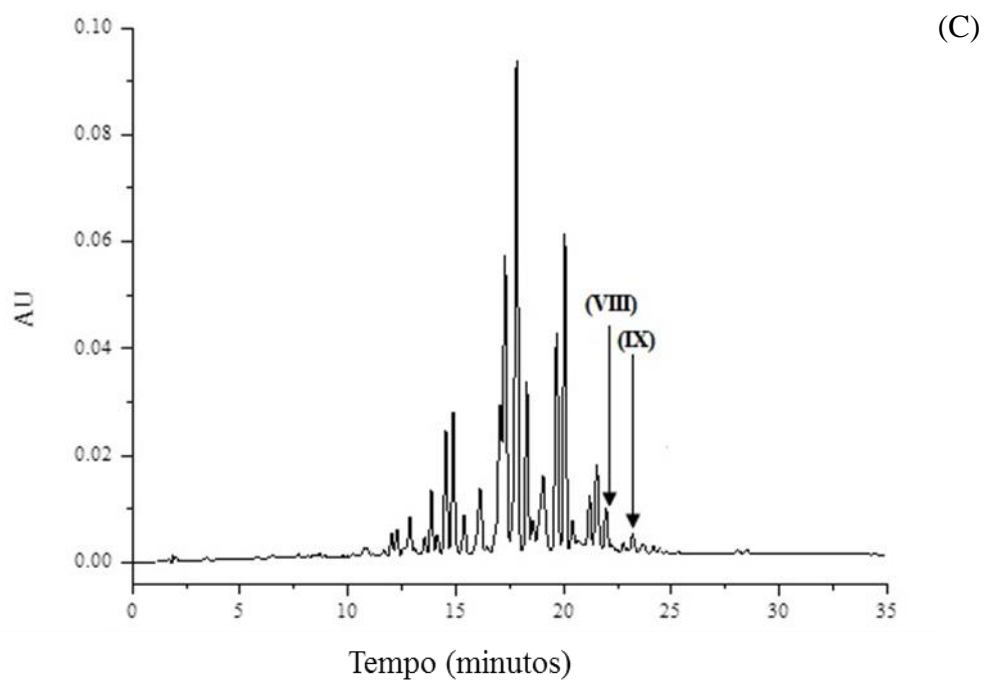
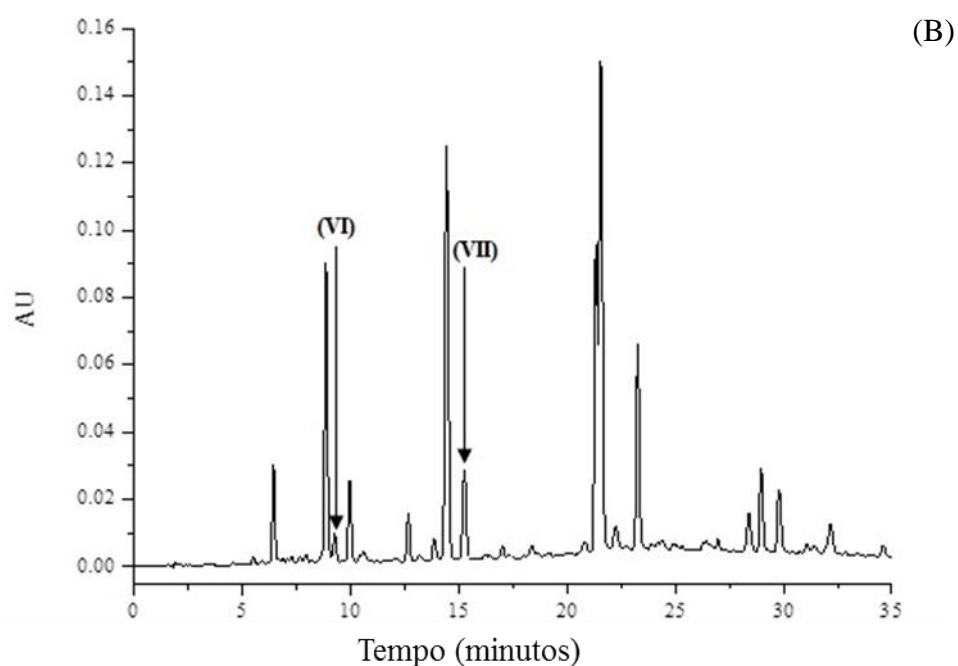
Os atributos instrumentais de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) das amostras de chás foram determinados por reflectância usando um espectrofotômetro Ultra Scan PRO Hunter Lab. (USA). As amostras foram preenchidas em uma célula de 1-cm e  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram determinados usando um Illuminant D<sub>65</sub> e um ângulo observado de 10°. Os parâmetros chroma ( $C^*$ ) foi estimado com  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  e o ângulo hue ( $h^*$ ) foi calculado por:  $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) + 180^\circ$  quando  $a^* < 0$  e  $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$  quando  $a^* > 0$ .

## 2.8 Análise dos compostos fenólicos e cafeína por HPLC

A análise do perfil dos fenólicos foi baseada na metodologia descrita por Zuo, Chen, Deng (2002), com pequenas modificações. Os chás foram filtrados por um filtro seringa (0,22 µm de nylon) antes das análises e 10 µL de cada amostra foi injetado. O sistema de HPLC (2695 Alliance, Waters, EUA) acoplado com um detector fotodiodo (PDA 2998 Waters, EUA), uma bomba quaternária e um autoinjeter foi utilizado. A separação foi realizada em uma coluna Symmetry<sup>®</sup> C18 com dimensões de 4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm

(Waters, EUA) a 20°C. A fase móvel foi composta do solvente A (2,5% de ácido acético, v/v) e do solvente B (acetonitrila). O seguinte gradiente foi aplicado: 3-9% B (0-5 min), 9-16% B (5-15 min), 16-36.4% B (15-33 min), seguido por lavagem e recondicionamento da coluna. O fluxo foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, e as corridas foram monitoradas a 280 nm (ácido gálico, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e cafeína), 320 nm (ácido 5-cafeoilquínico e ácido *p*-coumárico) e 350 nm (quercetina e quercitrina). A quantificação foi realizada usando as curvas de calibração dos padrões. As equações de regressão dos padrões, limite de detecção, limite de quantificação, tempo de retenção, e comprimento de onda usados para quantificar os compostos fenólicos nas amostras de chás são apresentados na Tabela 1, enquanto que alguns exemplos de cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 1.





**Figura 2.1** Cromatograma obtido para diferentes chás dos compostos fenólicos determinados (A) 280 nm de *C. sinensis*, (B) 320 nm de *B. trimera* e (C) 350 nm de *P. boldus*. (I) ácido gálico, (II) catequina, (III) cafeína, (IV) epicatequina, (V) procianidina B2, (VI) ácido 5-cafeoilquínico, (VII) ácido *p*-coumárico, (VIII) quercitrina, (IX) quercetina.

**Tabela 2.1** Parâmetros cromatográficos da cafeína e dos compostos fenólicos analisados por HPLC.

Compostos químicos	Tempo de retenção (min)	UV (nm)	Equações de regressão	$R^2$	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido gálico	3,22	271,5	$y = 1,27 \text{ E}+07 x + 24693$	0,999	0,15	0,50
Ácido 5-cafeoilquínico	9,29	326,9	$y = 1,86 \text{ E}+07 x + 877$	0,997	0,19	0,62
Ácido <i>p</i> -coumárico	15,28	309,6	$y = 5,29 \text{ E}+07 x + 88036$	0,999	0,03	0,09
Catequina	8,80	278,7	$y = 6,36 \text{ E}+06 x + 2309$	0,997	0,08	0,28
Epicatequina	12,45	278,4	$y = 5,53 \text{ E}+06 x + 161$	0,997	0,07	0,23
Procianidina B1	7,08	278,7	$y = 4,31 \text{ E}+06 x - 3176$	0,997	0,54	1,81
Procianidina B2	11,24	279,8	$y = 4,80 \text{ E}+06 x - 2352$	0,997	0,17	0,56
Quercetina	23,50	376,2	$y = 1,28 \text{ E}+06 x + 9269$	0,999	0,98	3,26
Quercitrina	22,24	349,0	$y = 1,56 \text{ E}+07 x + 4352$	0,998	0,27	0,89
Cafeína	10,00	273,9	$y = 2,03 \text{ E}+06 x + 45945$	0,999	1,74	5,81

Nota: LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

## 2.9 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Uma aplicação quimiométrica composta de análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise linear discriminante (LDA) foram realizadas no software Statistica 7,0 (Stat-Soft, EUA). Antes da aplicação quimiométrica, todas as variáveis foram autoescaladas para padronização da importância significativa de todas as respostas. Então, uma matriz de amostras ( $n = 51$ ) e de variáveis ( $n = 20$ ) foi construída, no qual as amostras foram adotadas como linhas e as variáveis em colunas, totalizando 1020 pontos de dados.

A PCA envolve um procedimento matemático que identifica os padrões nos dados e os expressa de maneira a destacar as semelhanças e as diferenças. A PCA foi aplicada para separar as amostras de acordo com a composição fenólica, cor e atividade antioxidante. Para este proposto, os resultados obtidos para cada parâmetro foram adotados em colunas e as amostras de chás em linhas. *Eigenvalues* maiores que 1,0 foram adotados para explicar a projeção das amostras em um gráfico de duas dimensões e a análise foi baseada nas correlações lineares (GRANATO et al., 2011).

HCA é um método preliminar para estudar os conjuntos de dados em busca de agrupamentos naturais entre as amostras caracterizadas pelos valores de um conjunto das variáveis medidas. Devido ao seu caráter não supervisionado, a HCA é uma técnica de reconhecimento de padrões que pode ser usada para revelar a estrutura residente em um conjunto de dados. A similaridade das amostras foram calculadas em base da distância Euclidiana, e o método aglomerativo de Ward foi usado para agrupar as amostras. O dendrograma impõe uma hierarquia sobre esta similaridade, de modo que é possível ter uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto das amostras usadas no estudo (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2011). Em ordem de comparar os resultados entre os *clusters* formados, o teste de Levene foi conduzido para checar a homogeneidade de variâncias, enquanto que análise de variância (*one-way ANOVA*) e o teste de Fisher foi aplicado para identificar as diferenças entre os *clusters*. Para as variáveis que as variâncias foram não-homogêneas ( $P < 0,05$ ) o teste não-paramétrico de comparação múltipla de Kruskal-Wallis foi usado. Valores de  $P$  abaixo de 0,05 foram considerados para rejeitar a hipótese nula.

LDA é uma técnica estatística supervisionada usada para encontrar combinações lineares das características no qual caracteriza ou separa duas ou mais classes de objetos. LDA é intimamente relacionada à análise de variância e análise de regressão linear, que também tenta expressar uma variável dependente como uma combinação linear de outras

características ou medidas (STATSOFT, 2013). Com o objetivo de classificar as amostras de chás de acordo com as espécies, a análise univariada pelo teste de Fisher foi conduzida primeiramente. No presente trabalho, os conteúdos de quercetina, quercitrina, flavonoides, catequina, e cromaticidade ( $C^*$ ) foram usados como as variáveis independentes, e o tipo de chás foram usados como as respostas. Os escores de classificação, dados em porcentagem, para cada caso e para cada grupo foram calculados pela equação (3);

$$S_i(\%) = c_i + w_{i1} * x_1 + w_{i2} * x_2 + \dots + w_{im} * x_m \quad (3)$$

no qual subscrito  $i$  denota o respectivo grupo; o subscrito 1, 2, ...,  $m$  denota as  $m$  variáveis;  $c_i$  é uma constante para o  $i$ 'ésimo grupo,  $w_{ij}$  é o peso para o  $j$ 'ésima variável no cálculo do escore de classificação para o  $i$ 'ésimo grupo;  $x_j$  é o valor observado para o respectivo processo para a  $j$ 'ésima variável e  $S_i$  é o escore de classificação resultante, dado em porcentagem.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos chás brasileiro variaram de 100,45 a 1034,48 mg GAE/L e o conteúdo de flavonoides de 34,09 a 179,88 mg CTE/L. Os resultados para a inibição de DPPH variaram de 12,64 a 68,60% de redução, e os resultados obtidos por FRAP de 654,98 a 10331,19  $\mu\text{mol TE/L}$  (Tabela 2). Atoui et al., (2005) encontraram resultados para conteúdo de fenólicos totais de *M. piperita*, *M. recutita* e *C. sinensis* variando de 442 a 5067 mg GAE/L. Os resultados encontrado por Gião et al. (2007) para *M. recutita* e *B. trimera* variaram de 196 a 308 mg GAE/L. A atividade antioxidante (DPPH) avaliada por Tsai et al. (2008) de diferentes ervas variou de 6,15 a 94,50% de redução. Os dados encontrados por Vaquero et al. (2010) para 13 diferentes ervas mostraram que o conteúdo de compostos fenólicos totais variaram de 50,30 a 925,00 mg GAE/L e a atividade antioxidante por DPPH variou de 21,50 a 86,50%.

As propriedades de cor das amostras de chás mostraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as espécies. Em relação à luminescência ( $L^*$ ), todas as amostras apresentaram baixos valores ( $L^* < 26$ ). A intensidade de cor ( $C^*$ ) também mostrou baixos valores, variando de 0,50 a 1,14 e os valores de hue ( $h^*$ ) variou de 31,17 a 111,63.



**Tabela 2.2** Atributos de cor, compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante *in vitro* dos chás brasileiros.

Espécies herbais	Preço e atributos de cor						Compostos fenólicos		Atividade antioxidante	
	Preço (US\$)/10 g	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i> *	Fenólicos totais (mg GAE/L)	Flavonoides (mg CTE/L)	DPPH (% redução)	FRAP (μM TE/L)
<i>Camellia sinensis</i> (n = 18)	1,62 ± 0,96	24,61 ± 0,55	0,20 ± 0,31	0,88 ± 0,49	0,99 ± 0,41	74,91 ± 28,38	1034,48 ± 416,24	179,88 ± 32,41	68,60 ± 22,40	10331,19 ± 4802,91
<i>Peumus boldus</i> (n = 5)	0,96 ± 0,44	25,07 ± 0,21	0,12 ± 0,06	1,06 ± 0,18	1,07 ± 0,19	83,81 ± 2,62	716,40 ± 124,19	126,87 ± 50,04	46,91 ± 8,31	4463,75 ± 607,19
<i>Matricaria recutita</i> (n = 5)	0,88 ± 0,11	24,84 ± 0,16	-0,04 ± 0,14	1,13 ± 0,09	1,14 ± 0,09	86,18 ± 18,67	285,96 ± 203,06	45,22 ± 8,04	12,32 ± 7,25	897,37 ± 239,56
<i>Baccharis trimera</i> (n = 4)	0,76 ± 0,17	24,93 ± 0,23	-0,28 ± 0,18	0,74 ± 0,24	0,81 ± 0,21	111,63 ± 15,43	176,60 ± 50,86	58,65 ± 4,61	18,32 ± 9,36	1080,01 ± 196,34
<i>Cymbopogon citratus</i> (n = 5)	0,93 ± 0,39	24,90 ± 0,49	-0,08 ± 0,15	0,82 ± 0,11	0,83 ± 0,12	94,79 ± 9,72	147,12 ± 30,74	46,35 ± 9,40	17,10 ± 12,68	757,22 ± 133,25
<i>Pimpinella anisum</i> (n = 5)	1,00 ± 0,11	25,23 ± 0,25	-0,41 ± 0,16	0,47 ± 0,37	0,72 ± 0,11	100,88 ± 50,60	100,45 ± 16,24	34,09 ± 3,28	14,30 ± 9,63	654,98 ± 49,33
<i>Mentha piperita</i> (n = 5)	0,78 ± 0,7	24,23 ± 0,30	0,23 ± 0,11	0,43 ± 0,08	0,50 ± 0,09	62,99 ± 11,10	470,07 ± 208,13	125,57 ± 45,67	35,24 ± 16,42	3464,59 ± 901,86
<i>Ilex paraguariensis</i> (n = 4)	1,22 ± 0,17	23,95 ± 0,14	0,30 ± 0,02	0,19 ± 0,08	0,37 ± 0,04	31,17 ± 11,28	672,87 ± 126,25	176,04 ± 40,50	49,66 ± 9,59	5065,75 ± 298,61

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

O coeficiente de correlação de Pearson é usado para expressar a força entre duas variáveis contínuas que são relacionadas uma com a outra. Entretanto, é essencial analisar a significância significativa de cada coeficiente de correlação e, de forma prática, isto pode ser conseguido por meio do cálculo do valor de P usando a análise de variância. Neste sentido, o uso da análise de regressão parece ser um modo adequado para demonstrar como estas variáveis estão associadas.

Usando uma correlação bivariada entre os atributos de cor e as outras variáveis de resposta, foi possível observar uma correlação significativa ( $P < 0,01$ ) entre o conteúdo de flavonoides e  $L^*$  ( $r = -0,42$ ;  $R^2 = 17,64\%$ ), e a coordenada  $a^*$  ( $r = 0,56$ ,  $R^2 = 31,36\%$ ), e os valores de  $h^*$  ( $r = -0,37$ ,  $R^2 = 13,69\%$ ). Além de ser estatisticamente significativo, o coeficiente de correlação apenas mostra uma tendência de como as variáveis respostas estão associadas. Em ordem de entender completamente a relação entre as variáveis, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi também calculado. Para flavonoides vs.  $L^*$ , por exemplo, somente 17,64% da variância no conteúdo de flavonoides foi explicada quando os valores de  $L^*$  mudaram.

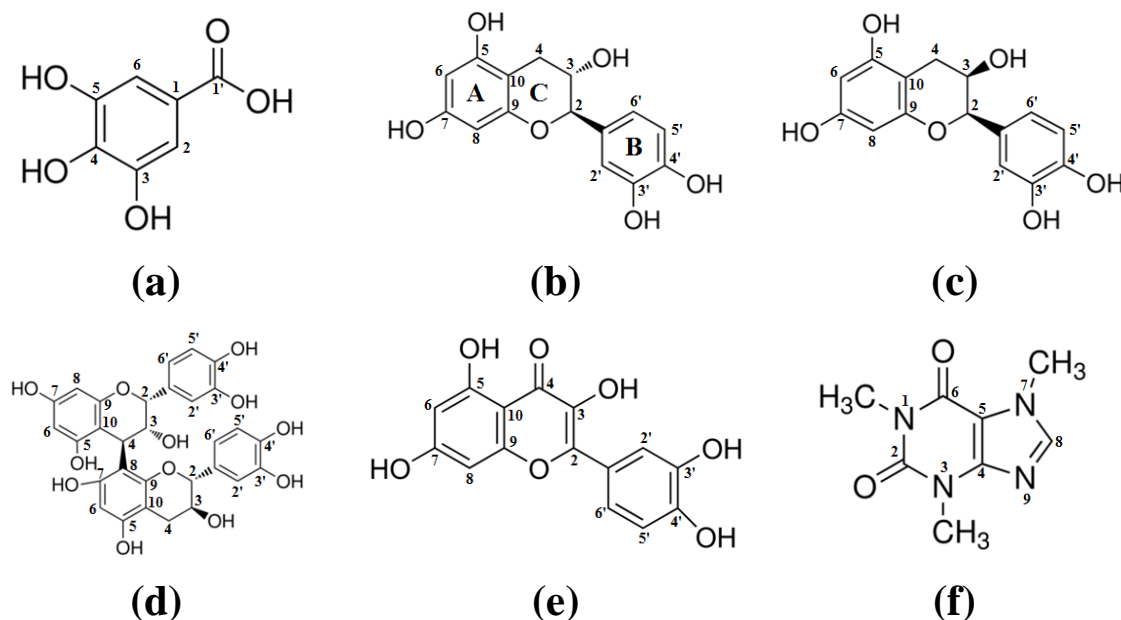
Os conteúdos individuais dos compostos fenólicos variaram dentro das espécies de chás, como observado na Tabela 3. O ácido gálico e procianidina B2 foram encontrados somente em chás *C. sinensis*, e o conteúdo de ácido 5-cafeoilquínico variou de 3,25 a 199,42 mg/L, ácido *p*-coumárico de 0,06 a 11,41 mg/L, catequina de 6,67 a 116,65 mg/L, epicatequina de 0,27 a 68,55 mg/L, quercetina de 7,49 a 59,77 mg/L, quercitrina de 19,33 a 41,19 mg/L, e cafeína de 69,63 a 5485,23 mg/L. Procianidina B1 foi encontrada apenas em *P. boldus* ( $169,07 \pm 46,31$  mg/L). Uma maior variação da composição fenólica inter e intra espécies é devido às condições de processamento empregado por cada companhia e também por causa das diferenças na composição dos chás, onde, cada companhia usa diferentes proporções de folhas e ramos. Além disso, a composição fenólica e, portanto a capacidade antioxidante dos chás de uma mesma espécie deve ser discrepante devido às diferenças nas condições ambientais, condições fisiopatológicas da planta, estresse hídrico, composição do solo, entre outros.

**Tabela 2.3** Composição química (mg/L) dos chás comercializados no Brasil.

Espécies herbais	Ácido gálico	Ácido 5- cafeoilquínico	Ácido <i>p</i> - coumárico	Catequina	Epicatequina	Procianidina B1	Procianidina B2	Quercetina	Quercitrina	Cafeína
<i>Camellia sinensis</i> (n = 18)	198,73 ± 78,02	5,22 ± 6,33	n.d	31,76 ± 58,49	68,55 ± 105,39	n.d	3,67 ± 8,77	n.d	21,13 ± 15,76	5485,23 ± 1637,22
<i>Peumus boldus</i> (n = 5)	n.d	n.d	n.d	116,65 ± 40,09	29,94 ± 35,30	169,07 ± 46,31	n.d	7,49 ± 1,34	41,19 ± 9,22	n.d
<i>Matricaria recutita</i> (n = 5)	n.d	41,51 ± 21,48	n.d	n.d	n.d.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Baccharis trimera</i> (n = 4)	n.d	63,43 ± 34,19	11,41 ±21,28	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	69,63 ± 113,35
<i>Cymbopogon citratu</i> s (n = 5)	n.d	37,97 ± 26,17	0,06 ± 0,14	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d	n.d.	n.d
<i>Pimpinella anisum</i> (n = 5)	n.d	26,24 ± 11,05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	19.33 ± 18.38	n.d
<i>Mentha piperita</i> (n = 5)	n.d	3,25 ± 5,91	4,31 ± 2,46	n.d	0,27 ± 0,60	n.d	n.d	59,77 ± 34,36	n.d	n.d
<i>Ilex paraguariensis</i> (n = 4)	n.d	199,42 ± 149,38	n.d	6,67 ± 13,33	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1244,63 ± 711,13

Nota: Resultados expressados como média ± desvio padrão (n = 3). N.d: não detectado ou valores abaixo do LOD.

Os resultados desta pesquisa mostraram correlações significativas ( $P < 0,01$ ) entre a atividade antioxidante medida por DPPH e FRAP com preço ( $r = 0,35$ ;  $r = 0,34$ , respectivamente), e compostos fenólicos totais ( $r = 0,87$  and  $R^2 = 75,69\%$ ;  $r = 0,90$  and  $R^2 = 81,00\%$ , respectivamente), e flavonoides totais ( $r = 0,79$  and  $R^2 = 62,41\%$ ;  $r = 0,77$  and  $R^2 = 59,29\%$ , respectivamente). Da mesma forma, Souza et al., (2011) analisaram os compostos fenólicos totais de 15 chás herbais comercializados no Brasil, incluindo as espécies de *C. sinensis*, *I. paraguarensis*, e *M. recutita* e encontraram  $r = 0,92$ . Oh et al. (2013) analisaram 11 extratos solúveis em água de espécies herbais diversificadas, incluindo *I. paraguarensis* e *C. sinensis*, e verificaram um coeficiente de correlação de 0,6258 ( $R^2 = 39,16\%$ ) entre os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante (DPPH). Assim como delineado por Lin, Liu e Mau (2008) e Granato, Katayama e Castro (2011), a capacidade antioxidante dos flavonoides pode ser devido à presença da dupla ligação no anel C, o que aumenta o poder nucleofílico. Além disso, as catequinas representam os principais compostos fenólicos em chás de *C. sinensis* e elas contêm uma ligação simples saturada na posição 2 e 3 (Fig. 2). Provavelmente, o conteúdo total, a estrutura química e número de grupamentos hidroxila presentes nos flavonoides devem ter sido responsáveis pela alta habilidade em eliminar radicais livre observados no presente estudo.



**Figura 2.2** Estrutura química de alguns compostos medido nos chás herbais brasileiros: (a) ácido gálico, (b) catequina, (c) epicatequina, (d) procianidina B2, (e) quercetina, (f) cafeína.

Os compostos fenólicos que mostraram correlação significativa ( $P < 0,05$ ) com DPPH e/ou FRAP foram ácido gálico ( $r = 0,75$  e  $R^2 = 56,25\%$ ;  $r = 0,79$  e  $R^2 = 62,41\%$ , respectivamente), catequina ( $r = 0,36$  e  $R^2 = 12,96\%$ ;  $r = 0,34$  e  $R^2 = 11,56\%$ , respectivamente), epicatequina ( $r = 0,34$  e  $R^2 = 11,56\%$ ;  $r = 0,53$  e  $R^2 = 28,09\%$ , respectivamente), procianidina B2 ( $r = 0,38$  e  $R^2 = 14,44\%$  somente para FRAP), quercitrina ( $r = 0,31$  e  $R^2 = 9,61\%$ ;  $r = 0,36$  e  $R^2 = 12,96\%$ , respectivamente), e cafeína ( $r = 0,71$  e  $R^2 = 50,41\%$ ;  $r = 0,78$  e  $R^2 = 60,84\%$ , respectivamente). Embora somente alguns compostos fenólicos apresentaram correlação com a atividade antioxidante, é interessante notar que as interações químicas (sinergismo, antagonismo e efeitos adicionais) entre os vários compostos fenólicos deve ter lugar nos chás, como em qualquer outra matriz alimentícia. Estas reações químicas são muito usuais em matrizes alimentares tal como chás e devem explicar os resultados observados no presente estudo. Uma correlação positiva e significativa ( $P < 0,001$ ) entre conteúdo de cafeína e a atividade antioxidante medida por DPPH e FRAP ( $r = 0,71$ ,  $r = 0,78$ , respectivamente) foi atingida. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Shi, Dalal, Jain (1991) que concluíram que a cafeína apresenta boa habilidade de eliminação de radicais hidroxilas e atribuíram as propriedades anticarcinogênicas deste composto a sua capacidade antioxidante.

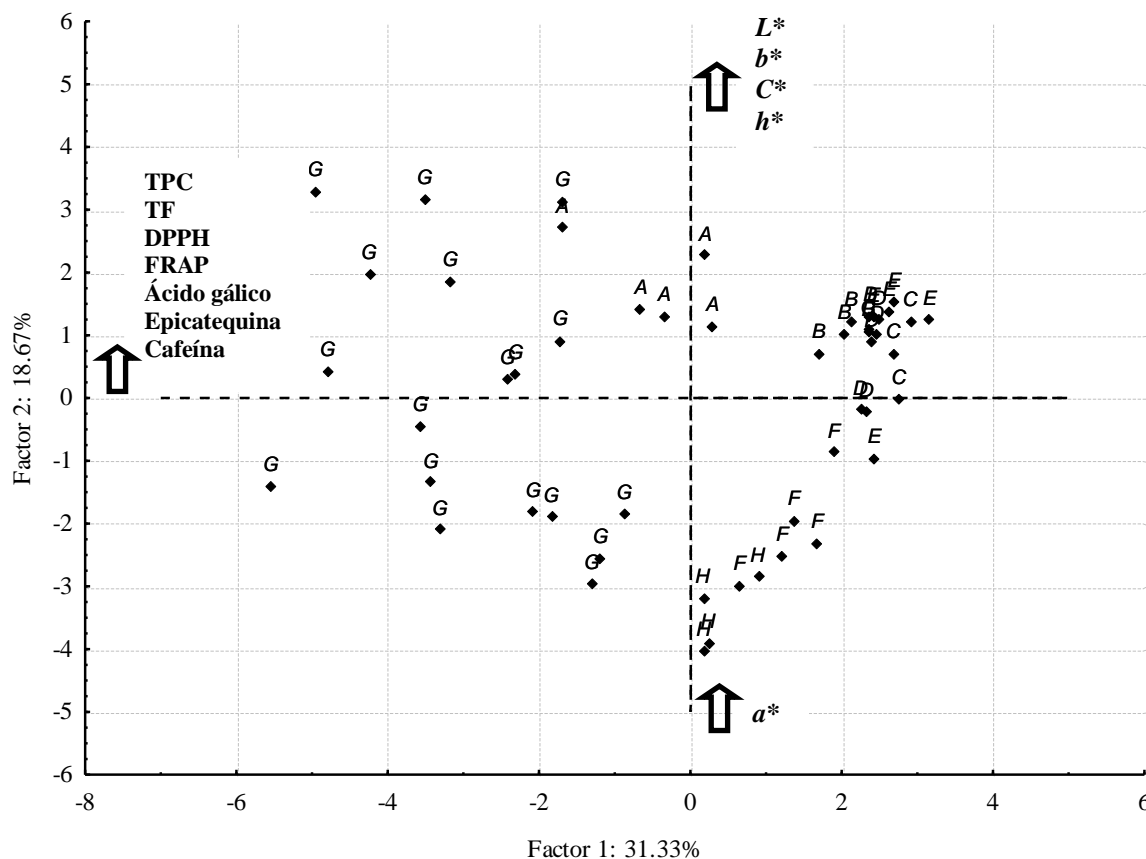
Em nosso estudo, o ácido gálico mostrou diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre os clusters, e uma correlação com a atividade antioxidante medida por DPPH e FRAP ( $r = 0,75$ ,  $r = 0,79$ , respectivamente). De acordo com Granato et al. (2011), os ácidos trihidroxibenzóicos, tal como o ácido gálico, tem uma elevada atividade antioxidante por causa do poder nucleofílico (alta capacidade de redução) de seus três grupos hidroxil disponíveis (Fig. 2).

No presente estudo, catequina e epicatequina mostraram uma correlação positiva e significativa ( $P < 0,05$ ) com DPPH ( $r = 0,36$ ,  $r = 0,34$ , respectivamente) e FRAP ( $r = 0,34$ ,  $r = 0,53$ , respectivamente), mas somente o conteúdo de catequina apresentou diferença significativa entre os diferentes *clusters* ( $P < 0,001$ ). A estrutura química dos flavan-3-óis determina uma relativa facilidade de oxidação e atividade de eliminação dos radicais livres. Embora a presença dos grupos galoil, o número e a posição dos grupos hidroxil (baseado no potencial redox) são reconhecidos em aumentar a atividade antioxidante, enquanto que a metoxilação e glicosilação da posição 3 aparentemente inibi a habilidade de redução (ARON; KENNEDY, 2008). Neste sentido, procianidina B2 correlacionou-se apenas com FRAP ( $r = 0,38$ ,  $P < 0,01$ ). Tsao et al. (2005) apresentaram que procianidinas apresentam maior capacidade antioxidante medida por FRAP quando comparada a DPPH. A capacidade antioxidante das procianidinas é devida a presença da unidade catecol no anel aromático B

(RIVE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), no qual estabiliza os radicais livres e tem habilidade de quelar metais e proteínas, devido a muitos grupos fenólicos *o*-dihidroxi (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

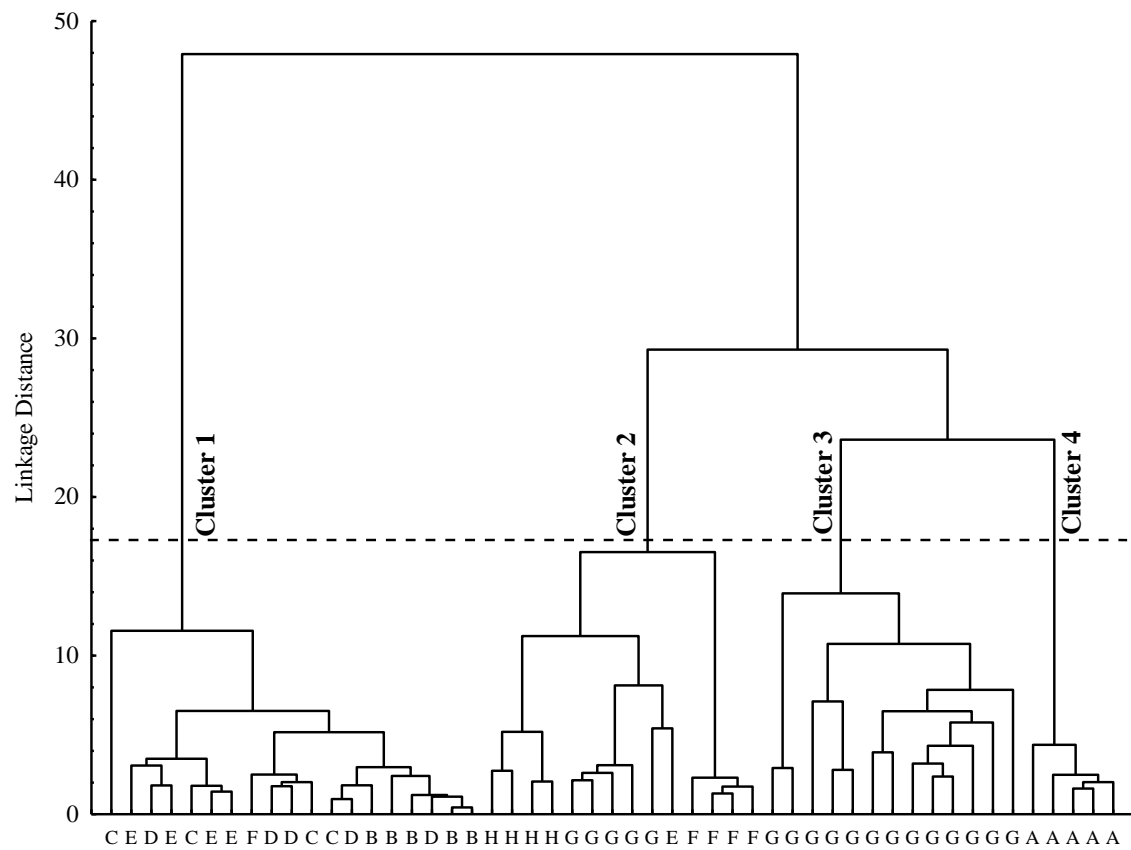
O conteúdo de quercitrina correlacionou ( $P < 0,05$ ) com DPPH e FRAP ( $r = 0,31$ ,  $r = 0,36$ , respectivamente) e a diferença significativa ( $P < 0,001$ ) na concentração deste composto foi também observada entre os *clusters*. Para flavonóis (quercetina glicosídeos), a combinação da fração catecol com a dupla ligação no C2-C3 e 3-OH (Fig. 2) providência uma atividade maior na habilidade de eliminar os radicais livres (VAN ACKER et al., 1996).

A análise de componentes principais foi aplicada em ordem de avaliar os dados dos compostos fenólicos determinados por HPLC, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, capacidade antioxidante e propriedades de cor dos chás brasileiros. A componente principal 1 (PC1) explicou 31,33% da variância total dos dados e a PC2 explicou 18,67%. Assim, o gráfico bidimensional apresentado foi capaz de explicar 50,00% da variabilidade dos dados experimentais (Fig. 3). As amostras foram separadas ao longo da primeira componente principal pelas diferenças observadas nos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, FRAP, ácido gálico, epicatequina, e cafeína. A segunda PC separou as amostras em base dos valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^*$ . É notável que todas as amostras de *C. sinensis* foram localizadas no 2º e 3º quadrante (lado esquerdo), e os chás de *P. boldus* foram localizados perto da origem. Neste sentido, é possível assumir que a PCA foi uma abordagem adequada para checar a similaridade entre as amostras de chás. De fato, o gráfico de dispersão fornecido pela PCA é muito importante uma vez que projeta todas as amostras em um gráfico bidimensional e as comparações podem ser realizadas entre as amostras baseadas nas variáveis respostas usadas no estudo.



**Figura 2.3** Gráfico de dispersão (PC1 vs. PC2) dos principais recursos da variabilidade entre as amostras de chás brasileiros. Abreviações: A (*Peumus boldus*); B (*Matricaria recutita*); C (*Baccharis trimera*); D (*Cymbopogon citratus*); E (*Pimpinella anisum*); F (*Mentha piperita*); G (*Camellia sinensis*); H (*Ilex paraguariensis*).

A similaridade das amostras foi avaliada usando a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e quatro *clusters* foram sugeridos (Fig. 4), e as médias de cada variável resposta também foram comparadas (Tabela 4). O *cluster* 1 apresentou as amostras com os menores conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides, quercetina, quercitrina, cafeína e atividade antioxidante (Tabela 4). Este *cluster* foi caracterizado pelas amostras principalmente das espécies *M. recutita*, *B. trimera*, e *C. citratus*. Por outro lado, o *cluster* 3 mostrou os maiores preço e os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante, ácido gálico e cafeína. Todas as amostras incluídas neste grupo foram dos chás de *C. sinensis*. O *cluster* 2 e 4 apresentaram características similares no preço, propriedades fenólicas e antioxidantes. Estes *clusters* foram formados pelas amostras das espécies *P. boldus*, *M. piperita*, *I. paraguariensis* e alguns chás de *C. sinensis*.



**Figura 2.4** Dendrograma obtido por análise hierárquica de agrupamentos para os chás brasileiros. Abreviações: *A* (*Peumus boldus*); *B* (*Matricaria recutita*); *C* (*Baccharis trimera*); *D* (*Cymbopogon citratus*); *E* (*Pimpinella anisum*); *F* (*Mentha piperita*); *G* (*Camellia sinensis*); *H* (*Ilex paraguariensis*).

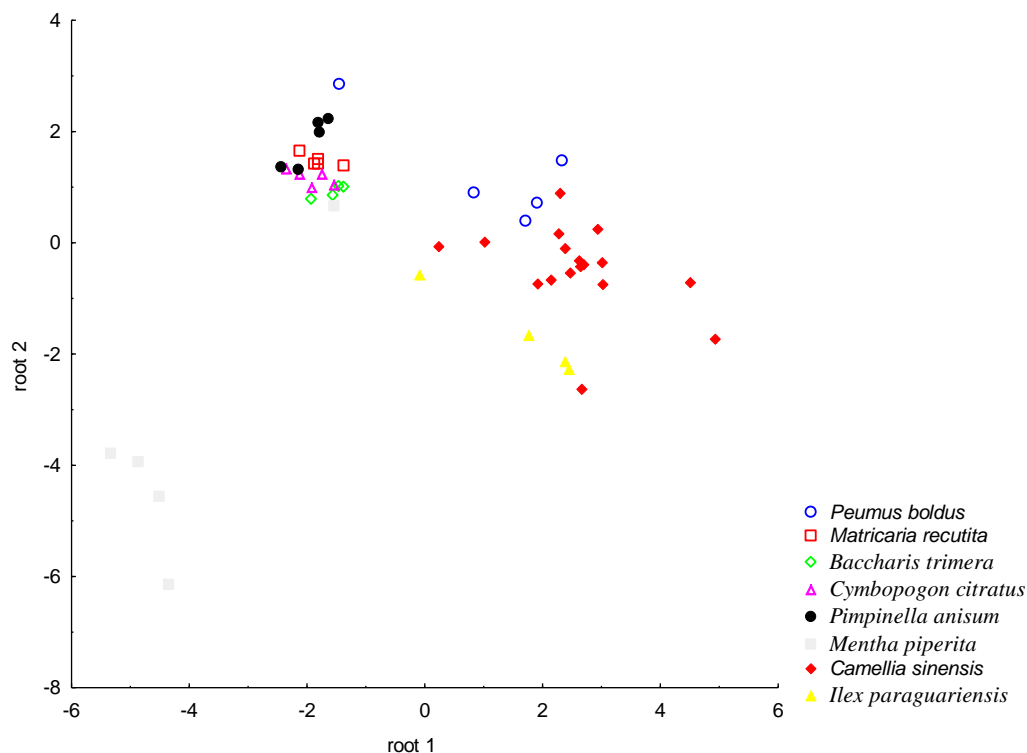


**Tabela 2.4** Dados agrupados das amostras de chás por preço, propriedades de cor, composição química e atividade antioxidante.

Respostas	Cluster 1 (n = 19)	Cluster 2 (n = 14)	Cluster 3 (n = 13)	Cluster 4 (n = 5)	PSD	P-valor*	P-valor**
Preço (US\$/10 g)	0,88 <sup>b</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	1,84 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,68	<0,001	<0,001
<i>L</i> *	24,95 <sup>a</sup>	24,14 <sup>b</sup>	24,80 <sup>a</sup>	25,07 <sup>a</sup>	0,51	0,15	<0,001
<i>a</i> *	-0,16 <sup>c</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,30	0,26	<0,001
<i>b</i> *	0,82 <sup>b</sup>	0,31 <sup>c</sup>	1,06 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,42	0,14	<0,001
Chroma ( <i>C</i> *)	0,87 <sup>b</sup>	0,53 <sup>c</sup>	1,11 <sup>a</sup>	1,07 <sup>ab</sup>	0,35	0,12	<0,001
Ângulo hue ( <i>h</i> *)	100,84 <sup>a</sup>	40,50 <sup>b</sup>	89,30 <sup>a</sup>	83,81 <sup>a</sup>	30,68	0,19	<0,001
Fenólicos totais (mg GAE/L)	199,33 <sup>b</sup>	585,72 <sup>a</sup>	1157,62 <sup>a</sup>	716,40 <sup>a</sup>	457,39	<0,01	<0,001
Flavonoides totais (mg CTE/L)	51,34 <sup>b</sup>	144,09 <sup>a</sup>	187,70 <sup>a</sup>	126,87 <sup>ab</sup>	67,28	<0,01	<0,001
DPPH (% redução)	16,29 <sup>b</sup>	46,52 <sup>a</sup>	72,36 <sup>a</sup>	46,91 <sup>a</sup>	27,76	<0,05	<0,001
FRAP (μmol TE/L)	1023,05 <sup>b</sup>	4999,54 <sup>a</sup>	11537,20 <sup>a</sup>	4463,75 <sup>ab</sup>	5003,08	<0,001	<0,001
Ácido gálico (mg/L)	n.d	60,98 <sup>b</sup>	209,48 <sup>a</sup>	n.d	106,15	<0,001	<0,001
Ácido 5-cafeoilquínico (mg/L)	39,89 <sup>ab</sup>	60,35 <sup>a</sup>	6,71 <sup>b</sup>	n.d	65,62	<0,001	<0,001
Ácido <i>p</i> -coumárico (mg/L)	2,74	1,10	n.d	n.d	1,32	0,09	0,62
Catequina (mg/L)	n.d	2,55 <sup>b</sup>	43,29 <sup>ab</sup>	116,65 <sup>a</sup>	49,82	<0,001	<0,001
Epicatequina (mg/L)	n.d	21,55	71,81	29,94	70,04	<0,001	0,19
Procianidina B1 (mg/L)	n.d	n.d.	n.d	169,07	52,44	NA	NA
Procianidina B2 (mg/L)	n.d	n.d	5,08	n.d	5,41	NA	NA
Quercetina (mg/L)	3,79 <sup>b</sup>	16,20 <sup>a</sup>	n.d	7,48 <sup>ab</sup>	20,32	<0,001	<0,001
Quercitrina (mg/L)	3,25 <sup>c</sup>	13,65 <sup>bc</sup>	17,25 <sup>ab</sup>	41,19 <sup>a</sup>	17,41	<0,05	<0,001
Cafeína (mg/L)	14,66 <sup>b</sup>	2118,41 <sup>a</sup>	5696,53 <sup>a</sup>	n.d	2767,22	<0,001	<0,001

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão agrupado. \* Valores de probabilidade obtidos pelo teste de Levene para homogeneidade de variâncias ou teste F, \*\* valores de probabilidade obtidos por teste t, *one-way* ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa.

O gráfico de dispersão 2D (*root 1* vs. *root 2*) resultante da aplicação da LDA para os dados é apresentado na Figura 5. As variáveis mais discriminantes foram quercetina (Wilks' Lambda = 0,0296, F = 19,53, p < 0,00001), quercitrina (Wilks' Lambda = 0,0134, F = 5,82, p = 0,0001), cromaticidade (Wilks' Lambda = 0,0099, F = 2,91, p = 0,0154), flavonoides totais (Wilks' Lambda = 0,0365, F = 25,32, p < 0,00001) e catequina (Wilks' Lambda = 0,0100, F = 3,01, p = 0,0128). A capacidade de classificação do modelo proposto pela LDA foi de 82,00%, no qual 100% das amostras de *Ilex paraguarensis*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria recutita*, e *Peumus boldus* foram corretamente classificadas. As amostras de *Baccharis trimera* não foram corretamente classificadas usando as variáveis independentes selecionadas no presente estudo. Um total de 60% dos chás de *Pimpinella anisum*, 80% dos chás de *Mentha piperita*, e 88,24% dos chás de *Camellia sinensis* foram corretamente classificados usando a LDA. Embora um número limite de amostras foram utilizadas, a LDA mostrou ser um método adequado para discriminar os chás brasileiros comerciais de acordo com a composição fenólica e as propriedades instrumentais de cor. Assim, mais amostras devem ser usadas para validar os resultados do nosso trabalho e outras aplicações estatísticas devem ser testadas para explicar os resultados experimentais.



**Figura 2.5** Gráfico de dispersão 2D (*root 1* vs. *root 2*) obtido pela análise linear discriminante para classificar os chás brasileiros baseado no conteúdo de quercetina, quercitrina, cromaticidade, flavonoides e catequina.

#### 4 CONCLUSÕES

Os chás brasileiros de oito diferentes espécies foram analisados para sua composição fenólica, propriedades de cor e capacidade antioxidante. Usando a PCA, somente 50% da variabilidade dos dados foram explicados, mas uma boa visualização de todos os resultados foi obtido. A HCA separou as amostras em quatro *clusters* e a principal espécie que apresentou os maiores conteúdos de compostos fenólicos e atividade de eliminação dos radicais livres foi a *C. sinensis*. Por outro lado, as amostras de *M. recutita*, *B. trimera* e *C. citratus* apresentaram os menores valores de atividade antioxidante e compostos fenólicos. A LDA foi efetiva na classificação das amostras de *I. paraguariensis*, *C. citratus*, *M. recutita*, *P. boldus*, *M. piperita*, *C. sinensis*, e *P. anisum* baseado no conteúdo de quercetina, quercetrina, flavonoides totais, catequina e cromaticidade. Portanto, as técnicas estatísticas multivariadas usadas no presente estudo mostraram ser adequadas para monitorar e avaliar a composição fenólica e a capacidade antioxidante *in vitro* dos chás comerciais.

### **CAPÍTULO 3**

#### **MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS MISTURAS DOS CHÁS VERDE, BRANCO E PRETO (*Camellia sinensis* L. Kuntze)**

O conteúdo desse capítulo foi publicado na revista Journal of Food Science and Technology  
(Anexo II)

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS  
E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS MISTURAS DOS CHÁS VERDE,  
BRANCO E PRETO (*Camellia sinensis* L. Kuntze)**

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi modelar a extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* das misturas dos chás verde, branco e preto (*Camellia sinensis*) usando um planejamento simplex-centróide acoplado com análise de regressão múltipla. O chá branco mostrou os maiores conteúdos de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*, enquanto que o chá preto apresentou o comportamento oposto. Os menores valores encontrados no chá preto são devido à oxidação dos compostos fenólicos durante a fermentação. Ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, epicatequina, epigallocatequina galato, epigallocatequina, e epicatequina galato apresentaram uma correlação significativa ( $P < 0,05$ ) com todos os métodos antioxidantes determinados. Todos os modelos matemáticos propostos foram significativos ( $P < 0,05$ ) e mostraram altos coeficientes de determinação ( $R^2_{\text{adj}} > 0,80$ ). Uma otimização simultânea foi realizada usando a função de desejabilidade para determinar as condições ótimas a extração de epicatequina, epigallocatequina galato, epicatequina galato, assim como a atividade antioxidante (DPPH e FRAP). Os resultados mostraram que o chá branco puro foi a melhor solução para obter o maior conteúdo de antioxidantes.

**Palavras-chave:** planejamento simplex-centróide, metodologia de superfície de resposta, catequinas, atividade antioxidante, cromatografia líquida de alta eficiência.

## 1 INTRODUÇÃO

Os chás (*Camellia sinensis* L. Kuntze) são originalmente da China sendo que mais tarde espalharam para a Índia e o Japão, em seguida para Europa e Rússia, chegando ao novo Mundo no final do século 17 (SHARANGI, 2009). Nos dias de hoje, é a segunda bebida mais consumida depois da água, e alguns dos mais conhecidos tipos de chás são: o verde, branco e o preto. As diferenças observadas nestes chás estão relacionados ao tipo de processo no qual são submetidos. O chá verde é processado por tosta ou vaporização das folhas imediatamente após a sua colheita de maneira que ocorra a inativação das polifenol oxidases (LAMBERT; ELIAS, 2010). Assim como o chá verde, o chá branco é um chá não fermentado, entretanto as folhas usadas são os novos brotos e as folhas jovens das plantas (PINTO, 2003). Em contraste, o processamento do chá preto é realizado com as folhas frescas que são fragmentadas e em seguida ocorre a ação das polifenol oxidases que ocasionam a oxidação das catequinas (LAMBERT; ELIAS, 2010).

O consumo dos chás proporciona importantes efeitos benéficos à saúde dos consumidores, incluindo os seguintes: efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, anticâncer, assim como efeitos protetivos contra degeneração, diabetes tipo 2 e doenças cardiovascular (ALMAJANO et al., 2008; YANG et al., 2009; CARLONI et al., 2013; PINTO, 2013). Os principais compostos encontrados nos chás que são relatados por reportarem estes efeitos são os flavan-3-óis (catequinas). Há muitas catequinas presentes nos chás de *Camellia sinensis*, mas os maiores conteúdos de catequinas são as (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) e (-)-epicatequina (EC) (WANG et al., 2000).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) acoplada com a modelagem matemática é uma ferramenta estatística adequada para o desenvolvimento de produtos funcionais e a extração de compostos bioativos. A RSM tem importantes aplicações no projeto, desenvolvimento e formulação de novos produtos alimentícios. É possível avaliar os efeitos das variáveis (fatores independentes) e suas interações (interações binárias ou ternárias, por exemplo), ao passo que esta metodologia experimental gera um modelo matemático que descreve o processo (BASSANI et al., 2014). Uma classe especial de RSM é o planejamento de misturas, no qual envolve o uso de diferentes combinações (geralmente três ou quatro) entre as componentes (fatores) por mudança na composição das misturas, e com isso é possível explorar tais mudanças que teriam um efeito em uma resposta específica. Além disto, a significância deste efeito precisa ser analisado pela análise de variância, por exemplo (LONNI et al., 2012).

Baseado no fato que os consumidores estão mais concientes sobre a relação entre o consumo de chás e suas funcionalidades, os objetivos deste estudo foram: i) modelar usando análise de regressão múltipla, a extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* das misturas binárias e ternárias dos chás verde, branco e preto de *Camellia sinensis* e ii) otimizar a extração de tais compostos e a atividade antioxidante *in vitro* de uma mistura de chá de *C. sinensis* usando a otimização mult-resposta.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2' - azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (neocuproína), acetato de amônio, cloreto de cobre (II), ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina galato, (-)-epicatequina galato, e cafeína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, acetonitrila e ácido acético foram de grau HPLC, enquanto que os outros reagentes usados no experimento foram de grau analítico.

### 2.2 Amostras de chás

Amostras autênticas de chás foram gentilmente doadas pela Hebarflora (São Paulo, Brasil). De acordo com o fabricante, o chá branco e o chá verde foram importados da China e o chá preto da Argentina. Os tamanhos das partículas das amostras foram de 0,40-0,84 mm. Um certificado de autenticidade das folhas pode ser obtido diretamente dos processadores.

### 2.3 Planejamento experimental

Primeiramente, 100 g de cada chá desidratado foi misturado e homogeneizado em agitação constante (150 rpm), e as misturas dos chás foram preparadas de acordo com o planejamento simplex-centróide contendo dez diferentes misturas (Tabela 1). Finalmente, um total de 2,0 g de cada mistura foi extraído com 100 mL de água destilada a 80 °C em um Erlenmeyer, coberto com uma tampa. O procedimento de extração foi realizado por um período de 7,5 min sob agitação. A mistura foi filtrada em papel Whatman #1 (qualitativo) e os chás foram transferidos para tubos Falcon e imediatamente congelados a -20 °C até o momento das análises (ZIELINSKI et al., 2014).

**Tabela 3.1** Planejamento simplex-centróide aumentado com dez tratamentos para as misturas dos chás verde, branco e preto.

Ensaio experimental	X1 [verde] (g)	X2 [branco] (g)	X3 [preto] (g)
1	2	0	0
2	0	2	0
3	0	0	2
4	1	1	0
5	0	1	1
6	1	0	1
7	1,334	0,333	0,333
8	0,333	1,334	0,333
9	0,333	0,333	1,334
10	0,67	0,67	0,66

#### 2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais (TPC)

Os TPC das misturas de chás foram analisados em triplicata pelo método colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). As análises foram conduzidas em tubos de ensaio, onde 8,4 mL de água destilada, 100 µL dos chás diluídos (1:10) e 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados. Depois de 3 min de reação, 1,0 mL de carbonato de sódio saturado (20% m/v) foi adicionado nos tubos e agitado vagarosamente por 10 segundos em um vortex. A absorbância foi medida depois de 1 hora usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 725 nm. As medidas foram comparadas com uma curva de calibração de ácido gálico (GA) e os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por litro de chá [mg GAE/L].

#### 2.5 Determinação do conteúdo de flavonoides totais (TFC)

Os TFC foram quantificados em triplicata pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (JIA; TANG; WU, 1999). Resumidamente, 250 µL da amostra diluída de chá (1:3) foi misturada com 2720 µL de uma solução etanólica (30%) e 120 µL de nitrito de sódio. Esta solução foi misturada bem e deixado reagir por 5 min e então 120 µL de uma solução de cloreto de alumínio (10%) foi adicionado nos tubos de ensaio e deixado reagir por mais 5 min. Então, 800 µL de uma solução de NaOH (1 mol/L) foi adicionado nos tubos e a absorbância foi medida contra um reagente branco (etanol) a um comprimento de onda de 510 nm usando



um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão). As medidas foram comparadas por uma curva de calibração de catequina (CT) [concentração de flavonoides =  $434,78 \times \text{absorbância}$ ;  $R^2 = 0,999$ ;  $P < 0,001$ ] e os resultados foram expressos como miligrama de equivalentes de catequina (CTE) por litro de chá [mg CTE/L].

## **2.6 Determinação do conteúdo de taninos (TC)**

A determinação dos TC nos extratos de chás foi realizada em triplicata através do método da vanilina-HCl descrito por Broadhurst e Jones (1978). Inicialmente, nos tubos de ensaio, 0,5 mL do chá diluído (1:10) foi adicionado para 3 mL do reagente de vanilina (4%, m/v, vanilina em metanol) e misturado em vortex. Em sequência, 1,5 mL do HCl concentrado foi adicionado e agitado novamente em vortex. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão), depois que a solução foi deixada em repouso no escuro por 15 min. Uma curva padrão foi plotada e as medidas foram comparadas. Os resultados foram expressos como mg de equivalente catequina (CE) por litro de chá [mg CE/L].

## **2.7 Atividade antioxidante dos chás**

A habilidade na eliminação dos radicais livres pelo método de descolorização do radical cátion ABTS foi determinada conforme descrita por Re et al. (1999). As soluções estoques incluíram a solução de ABTS (7,4 mmol/L) e a solução de persulfato de potássio (2,6 mmol/L). A solução de trabalho foi então preparada pela mistura das duas soluções de estoque em igual quantidade e deixada reagir por 16 h à temperatura ambiente (25 °C) no escuro. A solução foi então diluída pela mistura de 1 mL da solução de ABTS com 60 mL de metanol para obter uma absorbância de 1,1 a 734 nm usando um espectrofotômetro. As misturas de chás diluídas (1:25) foram adicionadas (15 µL) para 285 µL da solução de ABTS. A mistura foi mantida no escuro por 2 h, e a absorbância a 734 nm foi medida usando uma leitora de microplacas (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, EUA). Uma curva padrão foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000 µmol/L). Os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox pro litro de chá (µmol TE/L). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

A habilidade na eliminação dos radicais livres pelo método de DPPH foi determinada em triplicata pelo método proposto por Brand-Williams et al., (1995), com pequenas modificações. As amostras de chás diluídas (1:11) foram adicionadas (5 µL) para 195 µL de uma solução metanólica de DPPH (125 µmol/L). A absorbância foi medida a 517 nm usando

uma leitora de microplacas (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, EUA), depois da solução ter sido mantida em repouso no escuro por 30 min. Uma curva padrão foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000  $\mu\text{mol/L}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente de Trolox pro litro de chá ( $\mu\text{mol TE/L}$ ).

O potencial antioxidante total das amostras de chás foi determinado em triplicata usando método de redução do ferro (FRAP) de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. O reagente FRAP foi preparado pela mistura do tampão acetato (300 mM, pH 3,6), com uma solução de 10 mM TPTZ em 40 mM HCl, e 20 mM  $\text{FeCl}_3$  na proporção de 10:1:1 (v/v/v). O reagente de FRAP recém-preparado (300  $\mu\text{L}$ ) e as amostras de chás diluídas (10  $\mu\text{L}$ ) foram adicionados para cada placa e misturados vagarosamente por 10 segundos. As medidas foram realizadas usando uma microplacas (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, EUA), e a absorbância foi medida a 593 nm depois de 30 min. Uma curva padrão foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000  $\mu\text{mol/L}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente de Trolox por litro de chá ( $\mu\text{mol TE/L}$ ). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A capacidade antioxidante de redução do cobre (CUPRAC) dos chás foi determinada em triplicata de acordo com o método de Apak et al. (2008). Resumidamente, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de chá diluído (1:5) foi misturado com 1 mL de cada solução: solução de  $\text{CuCl}_2$  ( $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L), solução alcoólica de neocuproína ( $7.5 \times 10^{-3}$  mol/L), solução tampão de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 mol/L, pH 7.0), e 1 mL de água para completar o volume final de 4,1 mL. A absorbância foi medida contra um branco (água ultra pura) depois de 30 min de reação. O valor de CUPRAC das misturas de chás foi quantificado usando uma curva de calibração empregando Trolox (90 – 3000  $\mu\text{mol/L}$ ) como padrão, e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol TE/L}$ .

## **2.8 Compostos fenólicos individuais e cafeína determinados por HPLC**

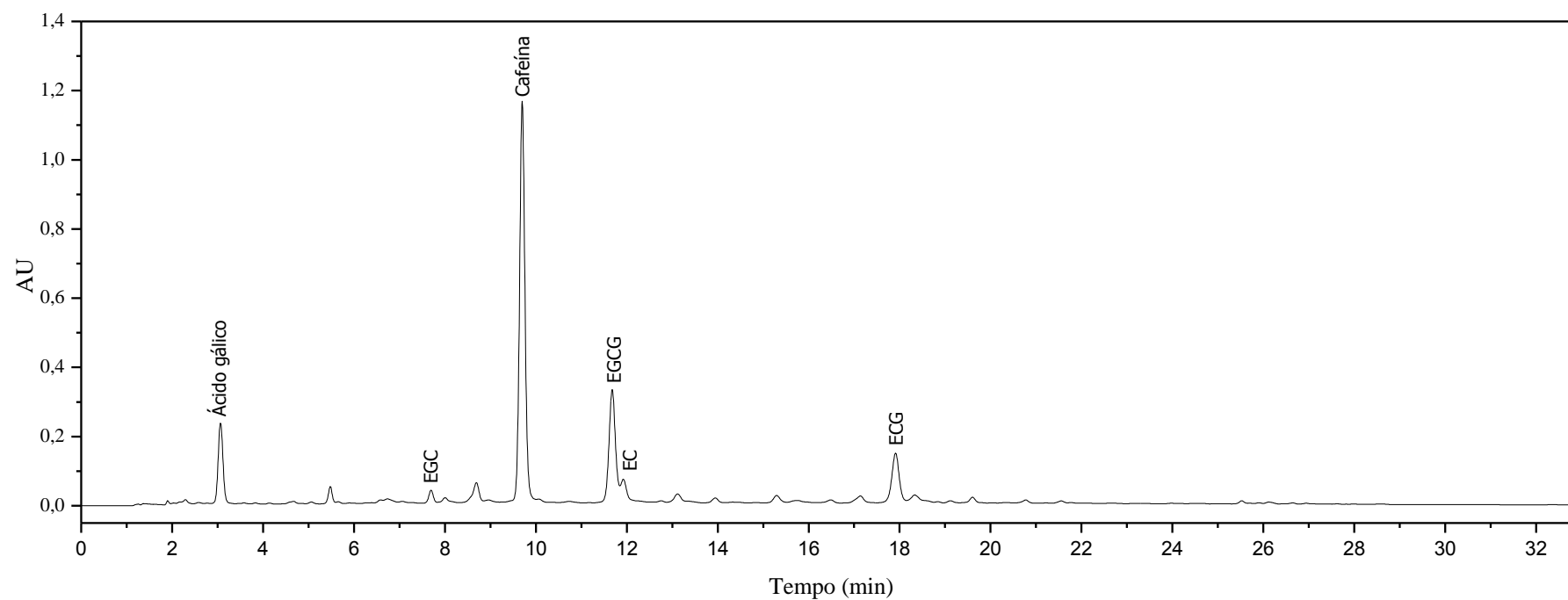
Inicialmente, as amostras de chás foram filtradas em filtro seringa de 0,22  $\mu\text{m}$  antes das análises e 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi injetado em um HPLC (2695 Alliance, Waters, EUA) acoplado com um detector fotodiodo (PDA 2998 Waters, EUA), uma bomba quartenária e um autoinjeter. A separação foi conduzida em uma coluna Symmetry® C18 com dimensões de 4,6 mm x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, EUA) a 20°C. A fase móvel foi composta do solvente A (2,5% de ácido acético, v/v) e do solvente B (acetonitrila). O fluxo de 1,0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  foi usado para as condições do gradiente: 3-9% B (0-5 min), 9-16% B (5-15 min), 16-36.4% B (15-33 min), seguido por lavagem e condicionamento da coluna. A identificação dos compostos fenólicos foi realizado por comparação do tempo de retenção e

dos espectros dos respectivos padrões. Todas as corridas foram monitoradas a 280 nm (ácido gálico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato, epicatequina galato, e cafeína), e 320 nm (ácido 5-cafeoilquínico). A quantificação foi realizada usando as curvas de calibração dos padrões. As equações de regressão dos padrões, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), tempo de retenção, e comprimento de onda usados para quantificar os compostos fenólicos nas amostras de chás são apresentados na Tabela 2, enquanto que um exemplo do cromatograma obtido é apresentado na Figura 1.

**Tabela 3.2** Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos e cafeína analisados por HPLC.

Compostos fenólicos	Tempo		Equação de regressão	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	de retenção (min)	UV (nm)				
Ácido gálico	3,02	271,5	$y = 12709 x + 24693$	0,997	0,16	0,50
Ácido 5-cafeoilquínico	9,29	326,9	$y = 18567 x + 877$	0,997	0,20	0,62
Epicatequina	12,29	279,8	$y = 5525 x + 161$	0,998	0,07	0,23
Epigallocatequina	7,58	270,3	$y = 1590 x + 919$	0,998	0,60	1,82
Epigallocatequina galato	11,39	275,1	$y = 10262 x - 3210$	0,999	0,90	2,73
Epicatequina galato	17,79	278,6	$y = 19298 x - 130036$	0,998	5,30	16,08
Cafeína	9,74	273,9	$y = 2088 x + 45945$	0,999	1,74	5,81

Nota: LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.



**Figura 3.1** Cromatograma obtido para a mistura (experimento 7) de chá verde (1,334 g), branco (0,333 g) e preto (0,333 g) para os compostos fenólicos determinados a 280 nm. Nota: EGC: epigalocatequina, EGCG: epigalocatequina galato, EC: epicatequina, ECG: epicatequina galato.

## 2.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Todas as variáveis tiveram sua normalidade checada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Hartley. *One-way* ANOVA foi realizada para detectar diferença significativa entre as amostras de chás para cada análise que foi realizada. Quando diferenças significativas foram detectadas pela análise de variância ( $P < 0,05$ ), o teste de Fisher foi usado para comparar as médias. Correlação de Pearson ( $r$ ) foi usada para avaliar o grau de associação entre as variáveis avaliadas. Um valor de  $p$  abaixo de 0,05 foi considerado para indicar diferença significativa (GRANATO et al., 2014).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi usada para modelar a extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos chás. Para este proposto, um modelo polinomial de segunda ordem foi usado para ajustar os dados experimentais. O modelo generalizado para modelar na RSM é mostrado na Equação (1):

$$Y_n(x) = \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i \leq j}^3 \sum_j^3 b_{ij} x_i x_j + b_{ijk} x_i x_j x_k$$

Onde  $Y_n$  é a resposta predita,  $b_i$ ,  $b_{ij}$ , e  $b_{ijk}$  são os coeficientes de regressão para os termos lineares, quadráticos e cúbico, respectivamente, e  $x_i$ ,  $x_j$  e  $x_k$  são as variáveis independentes. A significância estatística das equações foi examinada por ANOVA para cada resposta. Os termos que não foram significativos pela ANOVA foram removidos do modelo e os dados foram reajustados apenas com os parâmetros significativos ( $P < 0,05$ ), e as superfícies foram construídas. A adequação e a qualidade dos modelos foram avaliados pelo coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e seu  $R^2$  ajustado. Para todos os modelos, a normalidade da análise de resíduos foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Depois que os modelos foram construídos, uma otimização simultânea para maximizar a atividade antioxidante (DPPH, FRAP) e os conteúdos de EGC, EGCG, e EC foram obtidos pela função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich (1980). Em ordem de verificar o poder de predição dos modelos por comparação dos valores preditos com os dados experimentais, procedimentos experimentais foram realizados e os resultados foram avaliados pelos intervalos de predição ao nível de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistica 7,0 (StatSoft Inc., EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição química

Os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, e o conteúdo de taninos das misturas dos chás variam estatisticamente ( $P < 0,001$ ) de 1369,70 a 2248,49 mg GAE/L, de 219,94 a 320,23 mg CTE/L, e de 584,93 a 1372,93 mg CTE/L, respectivamente (Tabela 3). Entre todas as amostras avaliadas entre as misturas e os chás individuais, o chá branco foi o que mostrou os maiores conteúdo de fenólicos, enquanto que o chá preto apresentou as menores concentrações. Os resultado de TPC e TFC foram de acordo com Rusak et al., (2008) que avaliou diferentes condições de extração nos chás brancos e verde. A comparação entre a composição química de diferentes amostras de chás está ainda sob debate. Enquanto alguns autores clamam que o chá verde apresenta um maior conteúdo de compostos fenólicos em comparação a outros tipos de chás (GORJANOVIC et al., 2012), outros autores tem concluído que os fenólicos e a capacidade antioxidante são maiores em chás menos processados (processos de fermentação), tal como os chás branco e verde (VENDITTI et al., 2010), e nosso estudo suporta estes relatos.

**Tabela 3.3** Fenólicos totais, flavonoides, conteúdo de taninos e atividade antioxidante *in vitro* das misturas dos chás de *C. sinensis*.

[illegible]

Os compostos individuais também variaram significativamente ( $P < 0,001$ ) entre as dez misturas de chás (Tabela 4). O ácido gálico variou de 152,16 (chá verde) a 306,86 mg/L (chá branco), o ácido 5-cafeoilquínico de 0,97 (chá preto) a 3,83 mg/L (chá branco), a cafeína de 4164,96 (chá verde) a 5775,51 mg/L (chá branco), a epicatequina de 37,64 (chá preto) a 227,62 mg/L (chá branco), a epigallocatequina de 0 (chá preto) a 336,99 mg/L (chá branco), a epigallocatequina galato de 0 (chá preto) a 639,04 mg/L (chá branco), e a epicatequina galato de 0 (chá preto) a 230,71 mg/L (chá branco). Como observado anteriormente em outros resultados, o chá branco também mostrou os maiores níveis de fenólicos individuais quando avaliados por HPLC, e os menores conteúdos foram encontrados nas amostras de chá preto. A menor quantidade de flavan-3-óis no chá preto é devido à oxidação durante a fermentação do chá, no qual é um fenômeno de bioconversão das catequinas pelas polifenol oxidases em dímeros de catequinas (LAMBERT; ELIAS, 2010).

O conteúdo de catequinas nas amostras avaliadas no presente estudo foram de acordo com os resultados encontrado por Wang et al. (2000) para os diferentes chás e seus produtos consumidos na China, com conteúdos variando de 14,50 a 55,80 mg/L (EC), de 9,00 a 362,00 mg/L (EGC), de 9,50 a 326,00 mg/L (EGCG), e de 11,90 a 50,30 mg/L (ECG). Entretanto, os resultados para infusão a quente de chás brancos mostrado por Damiani et al. (2014) foram menores que os determinados no presente estudo para EGCG (0,80 a 30,30 mg/L) e ECG (7,00 a 41,40 mg/L). As variações nos resultados dos compostos fenólicos para os mesmos tipos de chás deve ser devido às diferenças observadas no clima e solo, tempo de colheita, estágio de desenvolvimento, parte das plantas usadas, tamanho das partículas, tempo e forma de processo, e método de extração (GORJANOVIC et al., 2012).



**Tabela 3.4** Compostos fenólicos individuais determinados por HPLC das misturas ternárias de chás.

Ensaio	Ácido gálico (mg/L)	Ácido 5- cafeoilquínico (mg/L)	Cafeína (mg/L)	Epicatequina (mg/L)	Epigallocatequina (mg/L)	Epigallocatequina galato (mg/L)	Epicatequina galato (mg/L)
1	152,16 <sup>h</sup> ± 0,86	2,30 <sup>e</sup> ± 0,03	4164,96 <sup>h</sup> ± 66,76	130,37 <sup>cd</sup> ± 1,69	239,35 <sup>c</sup> ± 3,00	297,67 <sup>g</sup> ± 5,10	81,53 <sup>g</sup> ± 2,10
2	306,86 <sup>a</sup> ± 1,02	2,64 <sup>d</sup> ± 0,06	5775,51 <sup>a</sup> ± 41,30	227,62 <sup>a</sup> ± 4,11	336,99 <sup>a</sup> ± 1,75	639,04 <sup>a</sup> ± 11,47	230,71 <sup>a</sup> ± 3,67
3	152,21 <sup>h</sup> ± 0,61	0,97 <sup>h</sup> ± 0,09	4963,04 <sup>de</sup> ± 77,31	37,64 <sup>h</sup> ± 0,83	ND	ND	ND
4	243,41 <sup>c</sup> ± 0,44	3,83 <sup>a</sup> ± 0,04	5451,67 <sup>c</sup> ± 12,61	179,02 <sup>b</sup> ± 5,70	134,55 <sup>g</sup> ± 0,68	482,73 <sup>c</sup> ± 5,18	160,44 <sup>c</sup> ± 0,38
5	235,60 <sup>d</sup> ± 0,86	2,90 <sup>c</sup> ± 0,04	5423,02 <sup>c</sup> ± 35,47	132,97 <sup>cd</sup> ± 1,99	142,10 <sup>f</sup> ± 0,96	348,45 <sup>e</sup> ± 6,55	137,39 <sup>d</sup> ± 1,53
6	168,13 <sup>g</sup> ± 1,67	1,60 <sup>g</sup> ± 0,09	4707,96 <sup>g</sup> ± 21,10	98,33 <sup>f</sup> ± 5,83	100,42 <sup>i</sup> ± 0,34	213,07 <sup>i</sup> ± 1,24	66,40 <sup>h</sup> ± 1,27
7	184,60 <sup>f</sup> ± 1,72	2,95 <sup>c</sup> ± 0,25	4811,76 <sup>f</sup> ± 40,13	127,38 <sup>d</sup> ± 4,80	183,24 <sup>e</sup> ± 3,06	320,09 <sup>f</sup> ± 1,69	97,54 <sup>f</sup> ± 0,61
8	252,76 <sup>b</sup> ± 1,79	3,57 <sup>b</sup> ± 0,15	5588,00 <sup>b</sup> ± 37,56	137,73 <sup>c</sup> ± 10,51	268,28 <sup>b</sup> ± 4,23	530,96 <sup>b</sup> ± 5,13	180,08 <sup>b</sup> ± 0,99
9	204,58 <sup>e</sup> ± 0,65	1,85 <sup>f</sup> ± 0,18	4945,18 <sup>e</sup> ±	58,15 <sup>g</sup> ± 3,00	108,97 <sup>h</sup> ± 1,68	223,27 <sup>h</sup> ± 1,46	84,29 <sup>g</sup> ± 0,97

			3,58				
10	205,96 <sup>e</sup> ± 1,68	2,57 <sup>d</sup> ± 0,11	5021,42 <sup>d</sup> ± 40,01	115,87 <sup>e</sup> ± 2,07	212,03 <sup>d</sup> ± 5,06	381,81 <sup>d</sup> ± 6,66	133,91 <sup>e</sup> ± 1,50
P	0,06	0,29	0,11	0,07	0,24	0,17	0,22
(Normalidade)*							
P (Hartley)**	0,67	0,13	0,15	0,12	0,11	0,23	0,31
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
(ANOVA)***							

Nota: Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.\* Valores de probabilidade obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk para normalidade, \*\* Valores de probabilidade obtidos pelo teste de Hartley (teste F) para homogeneidade de variâncias, \*\*\* Valores de probabilidade obtidos par one-way ANOVA. Letras diferentes na mesma coluna representam os resultados da diferença estatística de acordo com o teste de Fisher (P < 0,05).

### 3.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de ABTS, DPPH, FRAP, e CUPRAC e variaram significativamente ( $P < 0,001$ ) de 4420,83 a 12233,33  $\mu\text{mol TE/L}$ , de 1227,11 a 8866,00  $\mu\text{mol TE/L}$ , de 4696,34 a 12319,96  $\mu\text{mol TE/L}$ , e de 9778,19 a 22544,03  $\mu\text{mol TE/L}$ , respectivamente. O chá branco nestes testes foi o qual apresentou a maior atividade antioxidante (Tabela 3).

Os resultados encontrados para atividade antioxidante variaram em relação a cada método devido à diferença relativa na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos nos extratos. A ação do ABTS e do DPPH são caracterizados pela mistura dos mecanismos (transferência do átomo de hidrogênio e transferência simples de elétron) onde estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente (CRAFT et al., 2012). No nosso estudo, os métodos mostraram uma correlação alta e significativa ( $r_{\text{DPPH/ABTS}} = 0,93$ ,  $P < 0,001$ ), entretanto os resultados mostraram que a atividade antioxidante determinada por ABTS foi mais significativa que por DPPH (Tabela 3). De acordo com Kim et al. (2002), as vantagens na medida da ABTS é que o radical ABTS pode dissolver em fases aquosas ou orgânicas, ao contrário que o radical DPPH apenas pode ser solubilizado em meio orgânico. Portanto, esta característica do ABTS pode ser aplicado para ambos compostos com característica hidrofílica ou hidrofóbica de extratos alimentares ou fluídos biológicos.

De acordo com Craft et al. (2012), FRAP e CUPRAC são similares porque estas medidas são caracterizadas pela transferência simples de elétrons, resultando na redução de um íon metálico. Embora, o método FRAP apresenta algumas desvantagens em relação ao CUPRAC. Estas desvantagens incluem o fato de que o FRAP tem uma reação incompleta com os polifenóis antioxidantes, enquanto que o CUPRAC apresenta uma oxidação completa para os mais comuns flavonoides (APAK et al., 2007). Portanto, o CUPRAC mostra os maiores valores da capacidade antioxidante comparado com a medida de FRAP (Tabela 3). Uma alta e significativa correlação foi também observada entre as medidas ( $r_{\text{FRAP/CUPRAC}} = 0,94$ ,  $P < 0,001$ ).

O consumo dos chás está associado com os benefícios à saúde, particularmente devido a sua capacidade antioxidante. Leenen et al. (2000) realizaram a investigação do efeito no consumo de chá verde e preto na atividade antioxidante no plasma sanguíneo (medida realizada por FRAP) de 21 voluntários saudáveis. Os voluntários receberam uma simples dose de chá verde e preto (2 g de chá em 300 mL de água) e quatro amostras de sangue foram coletados a cada trinta minutos. O consumo de chás resultou em um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) na atividade antioxidante, atingindo o nível máximo em aproximadamente 60 min,

com o maior aumento observado para o consumo do chá verde. De acordo com Rietvel e Wiseman (2003), um número substancial de estudos em humanos tem demonstrado um aumento na capacidade antioxidante em humanos em aproximadamente 1 h depois do consumo de moderadas quantidades de chá verde e preto (1-3 copos/dia).

### 3.3 Análise de correlação

Uma correlação significativa ( $P < 0,001$ ) foi observada entre os compostos fenólicos totais e os flavonoides totais ( $r = 0,90$ ) e o conteúdo de taninos ( $r = 0,93$ ). Os TPC, TFC e TC foram também correlacionados significativamente ( $P < 0,05$ ) para ABTS ( $r_{\text{TPC}/\text{ABTS}} = 0,78$  E  $r_{\text{TC}/\text{ABTS}} = 0,83$ ), DPPH ( $r_{\text{TPC}/\text{DPPH}} = 0,88$ ,  $r_{\text{TFC}/\text{DPPH}} = 0,66$ ,  $r_{\text{TC}/\text{DPPH}} = 0,95$ ), FRAP ( $r_{\text{TPC}/\text{FRAP}} = 0,86$ ,  $r_{\text{TPC}/\text{FRAP}} = 0,67$ ,  $r_{\text{TPC}/\text{FRAP}} = 0,96$ ), e CUPRAC ( $r_{\text{TPC}/\text{CUPRAC}} = 0,95$ ,  $r_{\text{TFC}/\text{CUPRAC}} = 0,83$ ,  $r_{\text{TC}/\text{CUPRAC}} = 0,98$ ). Em um recente estudo, Gorjanovic et al. (2012) reportaram os resultados de seis diferentes chás (verde, amarelo, branco, oolong, preto e mate) que mostraram correlação entre os compostos fenólicos totais e FRAP ( $r = 0,87$ ,  $P < 0,05$ ), e DPPH ( $r = 0,81$ ,  $P = 0,05$ ), embora uma correlação significativa não foi observada ao nível de 5% entre fenólicos totais e ABTS. Entretanto, Carloni et al. (2013) encontrou uma correlação significativa ( $P < 0,01$ ) entre fenólicos totais/flavonoides totais com ABTS ( $r = 0,87$ ,  $r = 0,44$ , respectivamente) para os chás branco, verde e preto.

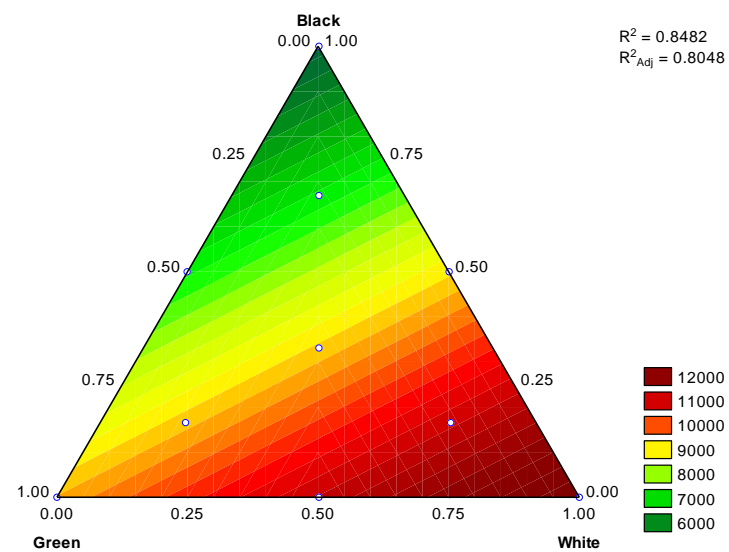
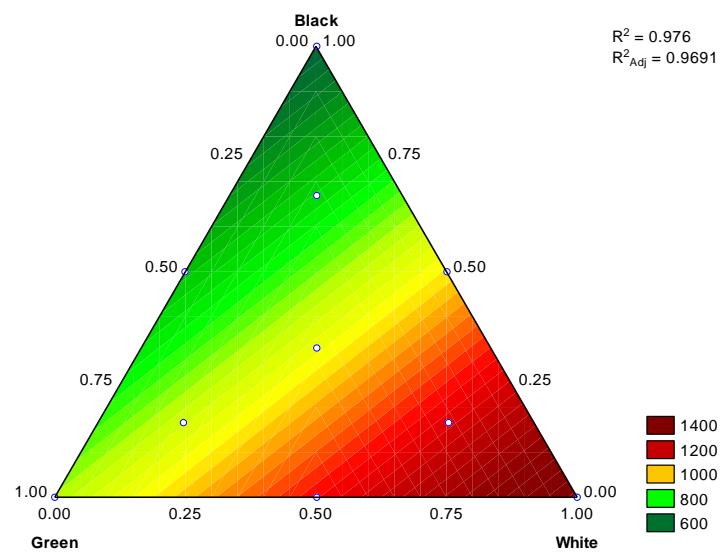
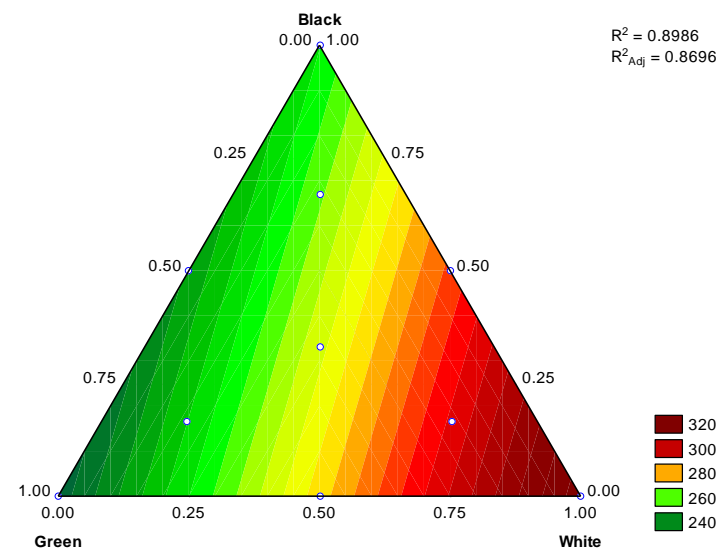
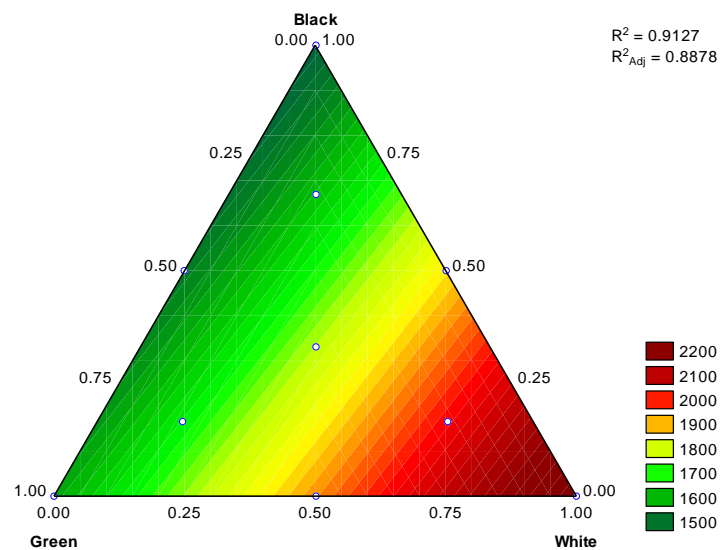
De acordo como os nossos resultados (Tabela 3), e com os reportados por Almajano et al. (2008), o ácido gálico é o mais abundante ácido fenólico encontrado nos chás. No presente estudo, este composto mostrou uma correlação positiva e significativa ( $P < 0,01$ ) com as medidas antioxidantes por ABTS ( $r = 0,76$ ), DPPH ( $r = 0,81$ ), FRAP ( $r = 0,81$ ), e CUPRAC ( $r = 0,94$ ). O ácido 5-cafeoilquínico (CQA) também mostrou uma correlação significativa ( $P < 0,03$ ) com os métodos antioxidantes ( $r_{\text{CQA}/\text{ABTS}} = 0,82$ ,  $r_{\text{CQA}/\text{DPPH}} = 0,92$ ,  $r_{\text{CQA}/\text{FRAP}} = 0,71$ ,  $r_{\text{CQA}/\text{CUPRAC}} = 0,77$ ). A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos tal como o ácido gálico e o ácido 5-cafeoilquínico é devido aos seus número e posição dos grupos hidroxil em relação ao anel aromático, ao tipo de ligação, a posição dos grupos hidroxil, e o tipo de substituintes no anel aromático. Além disso, o pH e a solubilidade dos ácidos fenólicos também são importantes na atividade antioxidante total destes compostos na matriz (GULÇIN, 2012). Os flavonoides são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante nas plantas. No nosso estudo, a atividade antioxidante *in vitro* correlacionou significativamente ( $P < 0,01$ ) com epicatequina ( $r_{\text{EC}/\text{ABTS}} = 0,87$ ,  $r_{\text{EC}/\text{DPPH}} = 0,86$ ,  $r_{\text{EC}/\text{FRAP}} = 0,94$ ,  $r_{\text{EC}/\text{CUPRAC}} = 0,90$ ); epigallocatequina ( $r_{\text{EGC}/\text{ABTS}} = 0,79$ ,  $r_{\text{EGC}/\text{DPPH}} = 0,77$ ,  $r_{\text{EGC}/\text{FRAP}} = 0,89$ ,  $r_{\text{EGC}/\text{CUPRAC}} = 0,80$ ); epigallocatequina galato ( $r_{\text{EGCG}/\text{ABTS}} = 0,91$ ,  $r_{\text{EGCG}/\text{DPPH}} = 0,96$ ,  $r_{\text{EGCG}/\text{FRAP}} =$

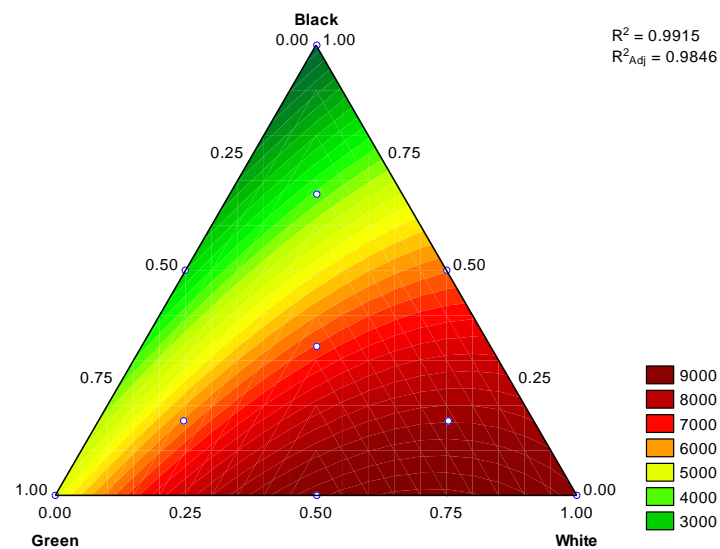
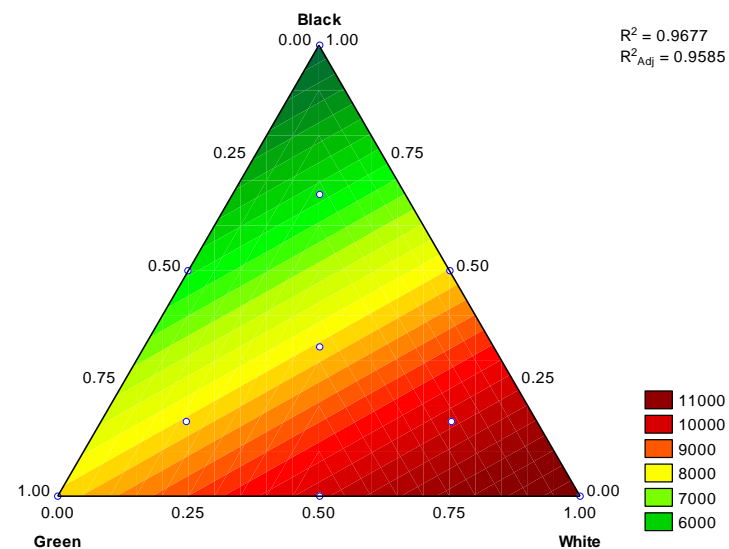
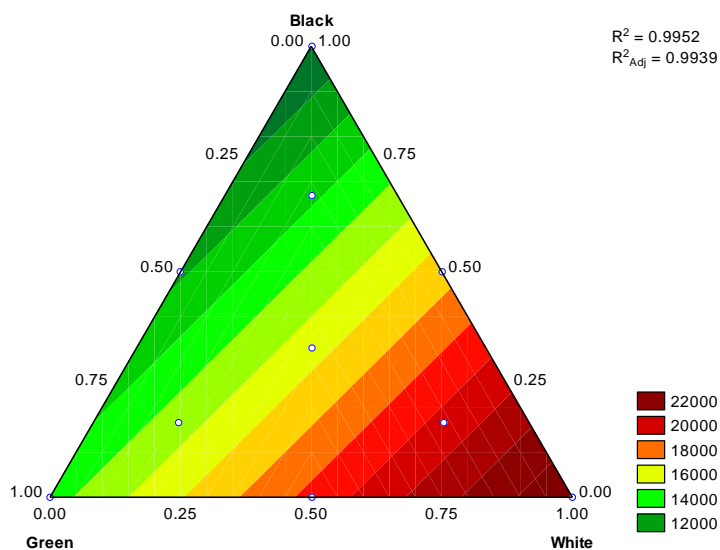
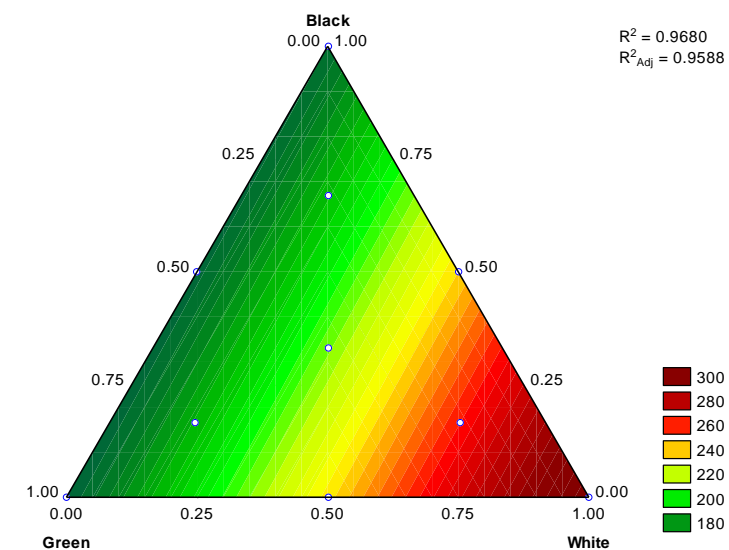
0,96,  $r_{\text{EGCG/CUPRAC}} = 0,98$ ); e epicatequina galato ( $r_{\text{ECG/ABTS}} = 0,90$ ,  $r_{\text{ECG/DPPH}} = 0,93$ ,  $r_{\text{ECG/FRAP}} = 0,93$ ,  $r_{\text{ECG/CUPRAC}} = 0,99$ ). A atividade antioxidante dos flavan-3-óis é devida a presença dos grupos galoil, a posição e o número dos grupos hidroxil (baseado no potencial redox), embora a metoxilação e glicosilação da posição 3 inibi a capacidade de redução (ARON; KENNEDY, 2008). Cai et al. (2006) avaliaram tradicionais plantas medicinais da China e mostraram que a atividade antioxidante dos flavan-3-óis foi na seguinte ordem: epigallocatequina galato (EGCG) > epicatequina galato (ECG) > epigallocatequina (EGC) > epicatequina (EC). A maior atividade da EGCG e ECG é por causa da estrutura catecol adicionada (grupo 3-galoil), no qual aumenta significativamente a atividade antioxidante.

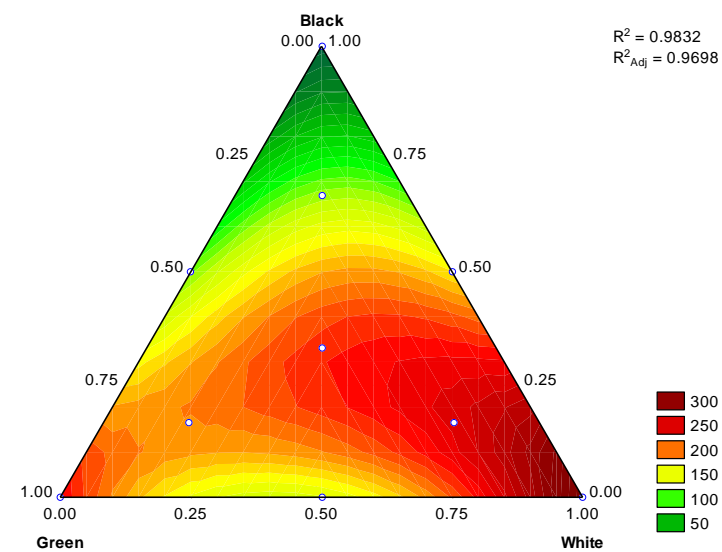
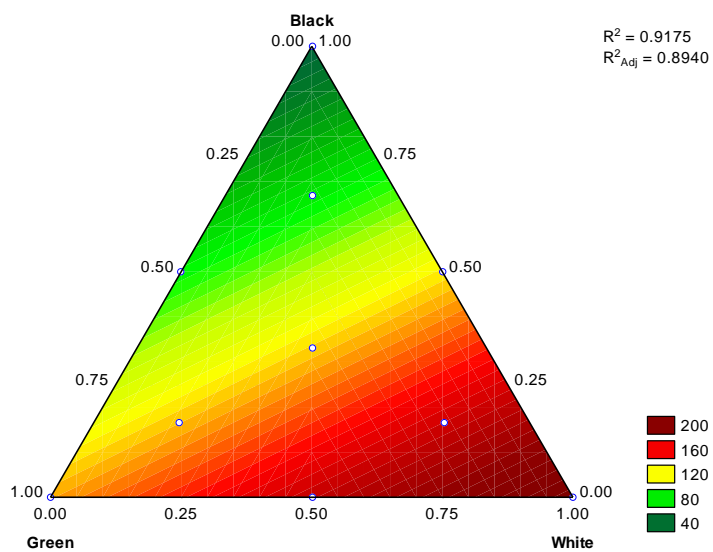
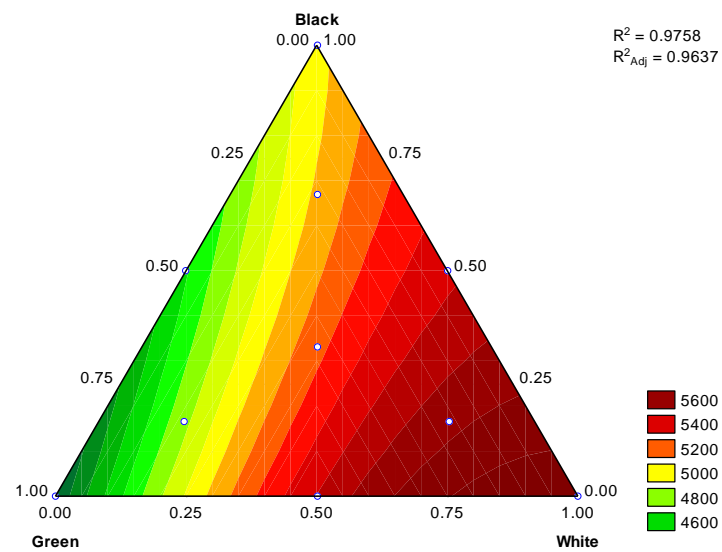
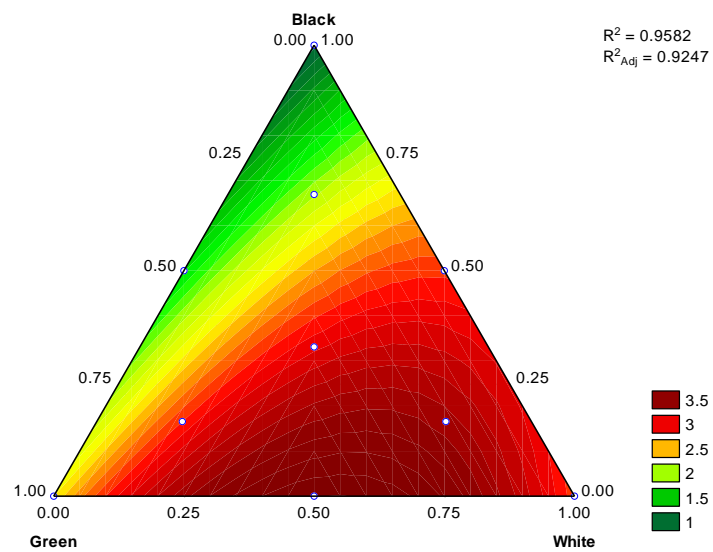
No presente estudo, ao contrário que foi observado para os compostos fenólicos, a cafeína apenas mostrou correlação significativa com DPPH ( $r = 0,64$ ,  $P = 0,047$ ) e CUPRAC ( $r = 0,78$ ,  $P = 0,008$ ). Em um estudo comparativo de diferentes chás brasileiros, incluindo *C. sinensis*, realizado por Zielinski et al. (2014), a cafeína apresentou uma correlação significativa ( $P < 0,001$ ) com DPPH ( $r = 0,71$ ) e FRAP ( $r = 0,78$ ).

### 3.4 Modelos de regressão múltipla (RSM)

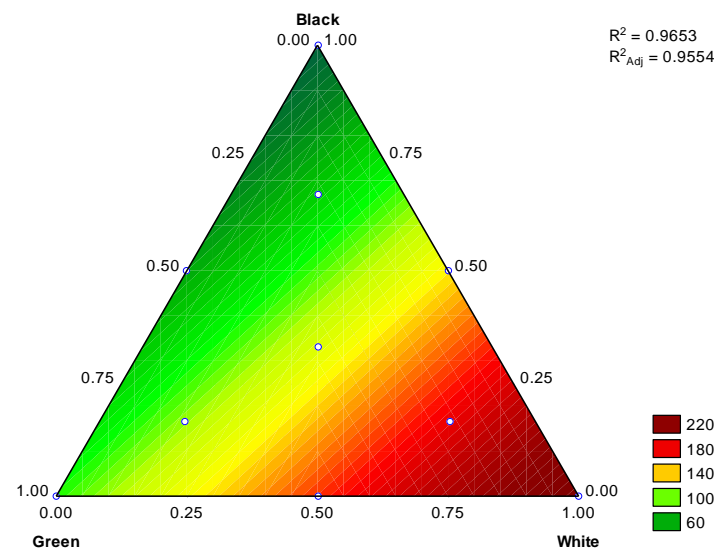
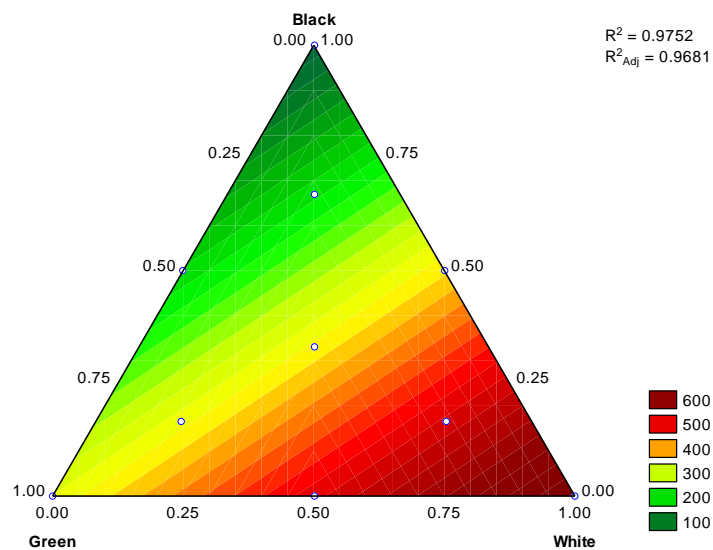
A RSM tem sido usada em muitos estudos para otimizar a extração de compostos bioativos em matérias vegetais. Usando um planejamento Box-Behnken, Maran et al. (2013) desenvolveram um processo supercrítico para a extração dos fenólicos totais, flavonoides, taninos, e atividade antioxidante das folhas de chás (*Camellia sinensis*). Os modelos foram encontrados pela RSM e o estudo da otimização usando a metodologia de Derringer foi realizado com a combinação de todas as variáveis independentes. Um ponto ótimo foi sugerido de maneira a maximizar a extração destes compostos. De maneira a verificar a influencia das misturas binárias e ternária dos chás (verde, branco e preto), a RSM foi usada para modelar os efeitos (Fig. 2), e os modelos matemáticos foram obtidos para predição da extração dos compostos bioativos (Tabela 5).



**(E)****(G)****(I)**







**Figura 3.2** Gráficos das superfícies de resposta para mostrar os efeitos dos chás verde, branco e preto no conteúdo de (A) compostos fenólicos totais, (B) flavonoides totais, (C) taninos, (D) ABTS, (E) DPPH, (F) FRAP, (G) CUPRAC, (H) ácido gálico, (I) ácido 5-cafeoilquínico, (J) cafeína, (K) epicatequina, (L) epigallocatequina, (M) epigallocatequina galato, (N) epicatequina galato.

**Tabela 3.5** Equações de regressão para os compostos fenólicos totais e individuais e atividade antioxidante *in vitro* como resultado da combinação dos chás verde, branco, e preto.

Variáveis	Equações	Número da equação
<b>Compostos bioativos</b>		
<b>TPC</b>	$Y = 1,569.29 X_1 + 2,261.99 X_2 + 1,447.35 X_3$	(2)
<b>TFC</b>	$Y = 229.73 X_1 + 318.48 X_2 + 251.77 X_3$	(3)
<b>TC</b>	$Y = 864.08 X_1 + 1,368.88 X_2 + 558.48 X_3$	(4)
<b>Ácido gálico</b>	$Y = 159.86 X_1 + 307.93 X_2 + 164.01 X_3$	(5)
<b>Ácido 5-cafeoilquínico</b>	$Y = 2.30 X_1 + 2.74 X_2 + 0.87 X_3 + 5.11 X_1 X_2 + 3.87 X_2 X_3$	(6)
<b>Cafeína</b>	$Y = 4,215.68 X_1 + 5,783.82 X_2 + 4,960.77 X_3 + 1,613.03 X_1 X_2$	(7)
<b>Epicatequina</b>	$Y = 131.29 X_1 + 210.90 X_2 + 31.19 X_3$	(8)
<b>Epigallocatequina</b>	$Y = 230.06 X_1 + 337.32 X_2 - 580.00 X_1 X_2 + 2,618.31 X_1 X_2 X_3$	(9)
<b>Epigallocatequina galato</b>	$Y = 0.32 X_1 + 0.66 X_2$	(10)
<b>Epicatequina galato</b>	$Y = 0.09 X_1 + 0.24 X_2$	(11)
<b>Atividade antioxidante</b>		
<b>ABTS</b>	$Y = 9,269.99 X_1 + 12,766.47 X_2 + 5,101.38 X_3$	(12)
<b>DPPH</b>	$Y = 4,869.22 X_1 + 8,852.75 X_2 + 1,095.43 X_3 + 9,242.81 X_1 X_2 + 4,970.30 X_2 X_3$	(13)
<b>FRAP</b>	$Y = 8,087.98 X_1 + 11,759.93 X_2 + 4,280.79 X_3$	(14)
<b>CUPRAC</b>	$Y = 13,578.69 X_1 + 23,007.52 X_2 + 10,064.92 X_3$	(15)

Nota:  $X_1$  = chá verde;  $X_2$  = chá branco;  $X_3$  = chá preto.

Os modelos propostos para os compostos fenólicos totais, flavonoides totais, e conteúdo de taninos foram significativos ( $P < 0,001$ ), e a análise de resíduos mostrou uma distribuição normal ( $P > 0,05$ ) e pode explicar mais que 89% da variância total dos dados com o  $R^2$  ajustado  $> 0,86$  ( $R^2$  ajustado é uma correção do  $R^2$ , levando em conta os graus de liberdade que envolve a soma total dos quadrados e a soma dos quadrados da regressão). Todos os efeitos lineares nos modelos contribuíram positivamente ( $P < 0,05$ ) na extração (Tabela 5).

Os compostos fenólicos individuais determinados por HPLC também foram modelados. Os modelos para o ácido gálico (Eq. 5) foi significativo ( $F = 105,78$ ,  $P < 0,00001$ ), e foi capaz de explicar 96,80% do total dos dados ( $R^2_{\text{adj}} = 0,9588$ ). O modelo para o ácido 5-cafeoilquínico foi significativo ( $F = 17,77$ ,  $P = 0,005$ ), com os resíduos apresentando distribuição normal ( $P = 0,26$ ) e foi capaz de explicar 95,82% dos dados com um  $R^2$  ajustado  $= 0,9247$ . A interação entre os chás verde e o branco ( $X_1X_2$ ), e o branco e o preto ( $X_2X_3$ ) influenciaram positivamente e significativamente na extração (Eq. 6). O modelo para cafeína foi significativo ( $F = 15,69$ ,  $P = 0,007$ ); os resíduos normais ( $P = 0,87$ ) e explicou 97,58% da variância dos dados ( $R^2_{\text{adj}} = 0,9637$ ). O efeito quadrático, no qual foi significativo e influenciou positivamente na extração da cafeína, foi à interação entre os chás verde e branco ( $X_1X_3$ ) (Eq. 7).

A extração dos quatros diferentes flavan-3-óis foram também modeladas: o modelo da epicatequina (Eq. 8) foi significativo ( $F = 38,95$ ,  $P = 0,0002$ ), os resíduos foram normais ( $P = 0,36$ ) e explicaram 91,75% da variância total ( $R^2_{\text{adj}} = 0,8940$ ). O modelo construído para epigallocatequina foi significativo ( $F = 32,73$ ,  $P = 0,002$ ); os resíduos mostraram distribuição normal ( $P = 0,34$ ) e 98,32% da variância dos dados foi explicada ( $R^2_{\text{adj}} = 0,9698$ ). O efeito quadrático ( $X_1X_2$ ) que foi significativo no modelo contribui negativamente na extração dos compostos, e a interação entre o chá verde, branco e preto contribuiu positivamente (Eq. 9). Para epigallocatequina galato (Eq. 10), o modelo encontrado foi significativo ( $F = 138,15$ ,  $P < 0,0001$ ); os resíduos normais ( $P = 0,26$ ) e foi possível explicar 97,53% da variância dos dados com um  $R^2 = 0,9682$ . O modelo da epicatequina galato foi significativo ( $F = 97,45$ ,  $P < 0,0001$ ); os resíduos foram normais ( $P = 0,73$ ) e 96,53% dos dados foram explicados ( $R^2_{\text{Adj}} = 0,9554$ ) (Eq. 11).

A análise de regressão múltipla para os ensaios antioxidante foi realizada para verificar o comportamento do modelo para cada teste antioxidante específico. Para o ABTS, o modelo (Eq. 12) foi significativo ( $F = 19,56$ ,  $P = 0,0014$ ); a análise de resíduo apresentou-se normal ( $P = 0,71$ ) e foi possível explicar 84,82% da variância ( $R^2_{\text{adj}} = 0,8048$ ). O modelo

determinado para o método DPPH foi significativo ( $F = 25,24$ ,  $P = 0,003$ ); os resíduos seguiram a distribuição normal ( $P = 0,14$ ) e o modelo matemático explicou 99,15% da variância total. A interação entre os chás verde e branco ( $X_1X_2$ ) e o branco e o preto ( $X_2X_3$ ) foram significativos e contribuíram positivamente na capacidade antioxidante (Eq. 13). O modelo encontrado para o método FRAP (Eq. 14) foi significativo ( $F = 104,93$ ,  $P < 0,0001$ ); a análise de resíduos realizada foi normal ( $P = 0,65$ ) e o modelo matemático explicou 96,77% da variância dos dados. O outro método também usado para avaliar a capacidade antioxidante foi o CUPRAC. O modelo proposto foi significativo ( $F = 731,45$ ,  $P < 0,00001$ ); a análise de resíduos mostrou-se normal ( $P = 0,52$ ) e foi possível explicar 99,52% de toda a variância (Eq. 15).

Depois de modelar a extração da atividade antioxidante das misturas dos chás, um procedimento de otimização simultânea usando a função desejabilidade (D) foi realizado com os modelos determinados para FRAP, DPPH, EC, EGCG, e ECG, objetivando maximizar os valores. O resultado ótimo sugerido foi com 100% de chá branco no qual seria a melhor solução para a otimização, apesar do fato que os efeitos dos chás verde e preto apresentarem significativo em termos das respostas. Se desejar consumir chá de *C. sinensis* como maior atividade antioxidante e maiores quantidade de flavan-3-óis, nenhuma mistura de chá verde, preto e branco poderia ser recomendada. Foi verificado que somente o chá branco poderia satisfazer as condições impostas na otimização, com um  $d = 0,9669$ , no qual aproximadamente 97% do objetivo proposto foi alcançado pela otimização. Entretanto, nos poderíamos enfatizar que nos estudos futuros deveria focar nas propriedades sensoriais das misturas dos chás de *C. sinensis* de maneira a balancear alguns efeitos sensoriais (amargor e adstringência, por exemplo) em combinação com as análises químicas realizada neste estudo. Objetivando-se verificar os erros em relação aos modelos preditos das variáveis de otimização, uma validação externa foi realizada usando três diferentes combinações de misturas e todos os valores observados foram dentro do intervalo de predição ao nível de 95% (Tabela 6). Devido aos baixos valores de erros absolutos obtidos para as variáveis DPPH (2,15%), FRAP (1,81%), EC (1,01%), EGCG (0,56 %), e ECG (1,33%) os modelos propostos poderiam ser usados para prever os valores resposta.

**Tabela 3.6** Verificação experimental dos modelos de superfície de resposta usados para otimização das misturas de chás.

Experimental			DPPH				FRAP				Epicatequina				Epicatequina galato				Epigallocatequina galato			
Ver de (g)	Bra nco (g)	Pret o(g)	Obser vado	Pred ito	- 95% Pred	+95 % Pred	Obser vado	Pred ito	- 95% Pred	+95 % Pred	Obser vado	Pre dito	- 95 % Pre d d	+95 % Pre d d	Obser vado	Pre dito	- 95 % Pre d d	+95 % Pre d d	Obser vado	Pre dito	- 95 % Pre d d	+95 % Pre d d
1,0	0,5	0,5	6387, 11 ± 91,91	6387 ,65	5516 ,66	7258 ,63	8208, 24 ± 27,47	8054 ,17	7164 ,30	8944 ,04	124,9 2 ± 1,47	126, 17	92, 30	160 ,04	105,1 2 ± 1,89	110, 18	84, 51	135 ,84	327,8 8 ± 2,98	337, 93	277 ,49	398 ,41
0,5	1,0	0,5	7948, 22 ± 31,68	7694 ,17	6816 ,12	8572 ,23	8824, 54 ± 48,34	8972 ,16	8082 ,29	9862 ,03	150,2 7 ± 3,68	146, 07	112 ,21	179 ,94	145,7 4 ± 2,17	147, 78	122 ,11	173 ,44	405,3 3 ± 4,40	423, 57	363 ,13	484 ,05
0,5	0,5	1,0	5340, 44 ± 42,21	5177 ,17	4306 ,11	6048 ,23	7468, 79 ± 10,76	7102 ,37	6212 ,48	7992 ,26	102,8 1 ± 2,77	101, 14	67, 28	135 ,01	95,44 ± 2,93	93,5 9	67, 93	119 ,26	284,2 8 ± 2,15	269, 18	208 ,81	329 ,74

#### 4 CONCLUSÃO

Um planejamento simplex-centróide foi desenvolvido para avaliar os chás individuais, assim como suas misturas binárias e ternária dos chás verde, branco e preto. De acordo com os resultados, a amostra de chá branco mostrou os maiores conteúdos de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*, enquanto que o chá preto apresentou os menores, isto é devido à oxidação dos flavan-3-óis durante o processamento. Usando a metodologia de superfície de resposta foi possível propor modelos matemáticos para a extração dos compostos fenólicos e propor qual a amostra de chá teria o maior efeito na atividade antioxidante *in vitro* das misturas de *C. sinensis*. Entretanto, a otimização que foi realizada usando a função de desejabilidade sugeriu que a formulação com 100% de chá branco sendo a melhor opção para atingir um chá com máximo conteúdo de flavan-3-óis e atividade antioxidante.

## **CAPÍTULO 4**

### **OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis* L. Kuntze) E SUAS IDENTIFICAÇÕES POR LC-DAD-Q- TOF-MS/MS**

O conteúdo desse capítulo foi publicado na revista LWT – Food Science and Technology (Anexo III)

## OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis* L. Kuntze) E SUAS IDENTIFICAÇÕES POR LC-DAD-Q-TOF-MS/MS

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi modelar a extração dos compostos antioxidantes e identificar os principais compostos fenólicos individuais do chá branco por LC-DAD-MS/MS. Um planejamento Box-Behnken foi aplicado para avaliar os efeitos do tempo, temperatura e concentração de etanol na extração dos fenólicos e da atividade antioxidante *in vitro*. Todos os modelos matemáticos propostos pela análise de regressão múltipla foram significativos ( $P < 0,001$ ) e explicaram mais que 85% da variância ( $R^2_{\text{adj}} > 0.80$ ). Uma otimização simultânea foi realizada usando DPPH, ABTS, FRAP, (-)-epigallocatequina galato, e (-)-epicatequina galato para maximizar a extração dos fenólicos e foi sugerido como condições ótimas de extração o tempo de 10 min, a temperatura de 66°C e a solução de 30% de etanol, com erro absoluto menor que 7%. As condições ótimas sugeridas foram confirmadas pela validação externa. Os principais compostos individuais identificados por espectroscopia de massas foram o ácido gálico, ácido 5-galoilquínico, cafeína, teobromina, galocatequina, epigallocatequina, epicatequina, epigallocatequina galato e epicatequina galato.

**Palavras-chave:** Box-Behnken, metodologia de superfície de resposta, flavan-3-óis, métodos antioxidante.



## 1 INTRODUÇÃO

Considerada a segunda bebida mais popular depois da água, os chás tem recebido grande interesse contínuo devido aos muitos efeitos benéficos que incluem redução dos riscos de câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (MUKHTAR; AHMAD, 2000; KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002; PINTO, 2013), além dos efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante que são intensamente relatados (BANSAL et al., 2013; ZIELINSKI et al., 2014). Um grande número de diversificados tipos de chás são produzidos ao redor do mundo entre os mais populares estão os chás preto, vermelho, amarelo e branco. A diferença entre o chá branco e os outros, é que a produção do chá branco (não fermentado) é realizada usando novos brotos e folhas jovens no qual após serem colhidas são secas imediatamente (HILAL; ENGELHARDT, 2007).

Os flavan-3-óis são os principais compostos bioativos encontrados em chás não fermentados de *Camellia sinensis* que exibem atividade antioxidante e capacidade de eliminar os radicais livres (ARON; KENNEDY, 2008). Entre estes, os principais compostos são as (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epicatequina (EC) e (+)-catequina (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000). No recente estudo publicado por Unachukwu et al., (2010) e Zhao et al., (2011), o chá branco mostrou os maiores conteúdo de compostos funcionais e atividade antioxidante comparada, por exemplo, ao chá verde. Portanto, o chá branco pode ser um bom recurso para suprir os compostos bioativos com propriedades funcionais.

Com o passar dos anos, a ligação entre os problemas de saúde e os conservantes em alimentos tem conduzido a diminuir os níveis permitidos destes, e com isso os extratos vegetais tem tornado um novo recurso para indústria de alimentos substituindo os antioxidantes sintéticos e suplementando os produtos com compostos bioativos. Para isto, diferentes métodos de extração têm sido usados para extrair os compostos fenólicos dos materiais vegetais, entre os mais comuns métodos que tem sido mencionado na literatura é o uso de solvente tal como etanol, acetona ou metanol, ou uma mistura com água (GARCIA-SALAS et al., 2010). Entretanto, para a aplicação em alimentos, os fenólicos são preferencialmente extraídos com etanol devido à baixa toxicidade, biocompatível e mais econômico que qualquer outro solvente (ILAIYARAJA et al., 2015). Durante o processo de extração algumas variáveis precisam ser avaliadas como temperaturas, tempo e concentração de solvente, assim um processo de otimização é essencial de maneira a aumentar o potencial máximo de extração. A metodologia de superfície de resposta (RSM) acoplada como a regressão linear múltipla é uma das ferramentas usadas, no qual é capaz de avaliar os

múltiplos parâmetros e suas interações e obter modelos matemáticos que são usados para definir as relações entre as respostas e os fatores independentes (BAS; BOYACI, 2002).

Portanto, os objetivos deste estudo foram i) modelar usando regressão linear múltipla acoplada com RSM a extração dos compostos fenólicos do chá branco, e ii) identificar os compostos fenólicos individuais no extrato otimizado usando LC-DAD-Q-TOF-MS/MS.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

O chá branco foi gentilmente doado pela Herbaflora (São Paulo, Brasil). De acordo com o fabricante, foi importado da China. Um certificado da autenticidade destas folhas pode ser obtido diretamente com os produtores. Reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetramethychromano - 2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) hidrocloreto), fluoresceína, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epigallocatequina galato, e (-)-epicatequina galato cafeína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, etanol, acetonitrila e ácido acético foram de grau HPLC, enquanto que os outros reagentes usados no experimento foram de grau analítico.

### **2.2 Métodos**

#### *2.2.1 Extração dos compostos fenólicos*

Resumidamente, 100 g de chá branco foi misturado e as amostras foram trituradas usando um pestilo e um mortar para obter um pó fino e homogêneo (0,5 mm). De maneira a otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos do chá branco, 1 g do chá em pó foi extraído com 50 mL de uma solução de etanol seguindo um planejamento de Box-Behnken com 15 experimentos. Os fatores estudados (variáveis independentes) para a extração dos compostos antioxidantes foram: tempo (min,  $X_1$ ), temperatura (min,  $X_2$ ), e concentração de etanol (% ,  $X_3$ ), com três níveis de variação (Tabela 1). A sequência dos experimentos foi realizada aleatoriamente, e as amostras foram centrifugadas (8160 g, 20 min a 4°C) (Sorvall RC-6-Plus, Fisher Scientific, EUA) após a extração foram transferidas para os tubos Falcon e imediatamente congeladas a -20 °C até o momento das análises.

### 2.2.2 *Determinação dos compostos fenólicos totais (TPC)*

O conteúdo dos fenólicos totais (TPC) foi determinado nos extratos de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) com pequenas modificações. Para este proposto, os valores da absorbância das amostras foram comparadas com uma curva de calibração de ácido gálico (GA) e os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por grama de chá [mg GAE/g].

### 2.2.3 *Determinação dos flavonoides totais (TFC)*

O conteúdo dos flavonoides totais (TFC) foi quantificado usando o método colorimétrico do cloreto de alumínio (JIA; TANG; WU, 1999). Então, a medida foi comparada com a curva de calibração de catequina (CT) e os resultados foram expressos como mg de equivalente de catequina (CTE) por grama de chá [mg CTE/g].

### 2.2.4 *Atividade antioxidante dos extratos*

A capacidade de eliminar radicais livres pelo método DPPH foi determinado em triplicata usando o método proposto por Brand-Williams, Cuveliet, e Berset (1995), com pequenas modificações. Primeiramente, todo extrato de chá diluído (1:11) (100  $\mu$ L) foi adicionado para 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (125  $\mu$ mol/L). A absorbância no comprimento de onda de 517 nm foi medida usando um espectrofotômetro (Ultrospec 1100 Pro, Inglaterra) depois de ter sido mantido em repouso no escuro por 30 min. Uma curva padrão de Trolox (100-1000  $\mu$ mol/L) foi plotada e os resultados foram expressos em mmol de equivalente de Trolox por g de chá [mmol TE/g].

A atividade de eliminação pelo radical ABTS dos extratos do chá foi determinada em triplicata usando o método descrito por Re et al. (1999), com pequenas modificações. Primeiramente, a solução de estoque de ABTS (7 mmol/L) e a solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L) foi preparada. A solução de trabalho foi então preparada pela mistura de 3 mL de cada solução de estoque e deixada reagir por 16 h a temperatura ambiente (25 °C) no escuro. A solução foi então diluída pela mistura de 4,0-4,5 mL da solução do radical ABTS com 250 mL de água destilada para obter uma absorbância de 0,70 a 734 nm. Os extratos de chás diluídos (1:100) (100  $\mu$ L) foram adicionado para 1700  $\mu$ L da solução de ABTS em tubos de centrifuga âmbar. A mistura foi misturada em vortex e estocada no escuro por 30 min, e a absorbância foi medida a 734 nm. Os resultados foram comparados a uma curva de calibração (Trolox de 100-1000  $\mu$ mol/L) e expressos em mmol de equivalente de Trolox por g de chá [mmol TE/g].

O potencial antioxidante total dos extratos de chás foi realizado usando o método do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) de acordo com o método descrito por Benzie e Strains (1996), com mínimas modificações. O reagente FRAP foi preparado pela mistura do tampão acetato (300 mM, pH 3,6), com uma solução de 10 mM TPTZ em 40 mM HCl, e 20 mM FeCl<sub>3</sub> na proporção de 10:1:1 (v/v/v). Então, 3,0 mL do reagente FRAP recém-preparado e 100 µL dos extratos diluídos (1:25) foram adicionados nos tubos de ensaio e misturados por 10 segundos. As medidas foram realizadas usando um espectrofotômetro a 593 nm depois de 30 min no escuro. A absorbância foi comparada a uma curva padrão (Trolox 100-1000 µmol/L) e os resultados foram expressos em mmol de equivalente Trolox por grama de chá [mmol TE/g]. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

O método de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) foi realizado para medir a capacidade de eliminação do radical peroxil dos extratos baseado no método descrito por Huang et al. (2002). Primeiramente, os extratos foram diluídos (1:500) em tampão fosfato (75 mmol/L, pH 7,4). Assim, um sistema automático de pipetagem em microplacas (Precision 2000, BIO-TEK Instruments, EUA) foi usado para transferir as soluções poço por poço. Para as análises, uma leitora fluorescente de microplacas (FLx 800, BIO-TEK Instruments, EUA) foi usada com filtros fluorescentes para o comprimento de onda de excitação de 485/20 nm e um comprimento de emissão de 528/20 nm programado para ler todo minuto depois da adição do AAPH (153 mmol/L em tampão fosfato 75 mmol/L, pH 7,4) por 50 min. A área sob a curva do decaimento fluorescente foi integrada usando o software KC4 3,0. Cada extrato de chá foi medido três vezes, e os resultados foram expressos como mmol de equivalentes de Trolox por grama (mmol TE/g).

### 2.2.5 *Análise de HPLC-DAD para EGCG, ECG, EC, e catequina*

A análise de HPLC foi realizada em triplicata de acordo com o método proposto por Zielinski et al. (2015), com pequenas modificações. Primeiramente, os extratos de chás foram filtrados em filtros seringas (0,45 µm, nylon) antes das análises e 10 µL das amostras foram injetados em uma cromatógrafo líquido de alta eficiência (2695 Alliance, Waters, EUA) acoplado com um detector fotodiodo (Waters 2996, Waters, EUA), bomba quartenária e um autoinjeter. A separação foi conduzida usando uma coluna Gemini<sup>®</sup> C18 com as dimensões de 4,6 mm x 150 mm, 5,0 µm (Phenomenex, EUA) a 25 °C. A fase móvel consistiu do solvente A (0,1% de ácido acético, v/v) e do B (acetonitrila) com o fluxo de 0,8 mL/min. Um gradiente linear foi programado da seguinte forma: 0-5 min, 3-9% B, 5-15 min, 9-16% B, e 15-33 min, 16-36,4% B, seguido pela lavagem e condicionamento da coluna. A

identificação dos flavan-3-óis foi realizada por comparação do seu tempo de retenção e espectro dos padrões de referencia (EGCG, ECG, EC, e catequina) e a quantificação foi realizada por calibração externa e os resultados expressos em mg/g. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.2.6 HPLC–DAD–Q-TOF–MS/MS

A eluição do HPLC (mesmo método descrito na análise de HPLC-DAD) foi inserido no espectrofotômetro de massa (Q-TOF MS) (Micromass, Waters, EUA) usando ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo. Primeiramente, Q-TOF MS foi calibrado usando iodeto de sódio para o modo negativo com a massa variando de 100-1000. Então, o espectro de massas completo das amostras foi adquirido usando uma voltagem capilar de 1,2 kV e uma voltagem de cone de 35 V. O fluxo do gás no cone foi de 50 L/h e o fluxo do gás de dessolvatação foi de 900 L/h. A temperatura do gás de dessolvatação e a temperatura da fonte do íon foram de 250 °C e 120 °C, respectivamente. O espectro MS/MS foi adquirido usando energia de colisão de 30 V.

## 2.2.7 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Primeiramente, todas as variáveis foram checadas para a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley). Como todas as variáveis mostraram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, considerando  $P > 0,05$ , então a *one-way* ANOVA foi realizada para detectar a diferença significativa entre os extratos de chás para cada variável dependente. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi usado para avaliar a força entre duas variáveis contínuas e entre a variável avaliada. Um  $p$ -valor abaixo de 0,05 foi considerado significativo.

De maneira de modelar a extração dos compostos fenólicos do chá branco, a metodologia de superfície de respostas (RSM) acoplada com regressão linear múltipla foi usada. Assim, um modelo polinomial de segunda ordem foi usado para ajustar os dados experimentais. O modelo generalizado usado na RSM é mostrado na Equação (1):

$$Y_n(x) = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

onde  $Y_n$  é a resposta predita,  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ , e  $b_{ij}$  são os coeficientes de regressão para os termos lineares, quadráticos e as interações, respectivamente, e  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis

independentes. A significância estatística das equações foi examinada pela ANOVA para cada resposta, onde os termos que não foram significativos foram removidos do modelo e os dados foram reajustados somente para os termos significativos ( $P < 0,05$ ) e as superfícies foram construídas. A qualidade dos ajustes foram avaliados por  $P_{\text{lack-of-fit}}$ , coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e seu  $R^2$  ajustado.

Depois dos modelos matemáticos foram obtidos, uma otimização multi-resposta usando a função de desabilidade proposta por Derringer e Suich (1980) foi usada para maximizar a atividade antioxidante (DPPH, ABTS, e FRAP) e o conteúdo individual de EGCG e ECG. De maneira a verificar a adequação dos modelos, uma validação externa foi conduzida no ponto ótimo sugerido e os resultados foram avaliados pelos seus erros absolutos (%) e pelos intervalos de predição ao nível de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Statistica v. 7 (StatSoft Inc., EUA).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Composição dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante *in vitro*.**

Os valores médios dos extratos de chás são mostrados na Tabela 1 e 2. Todas as variáveis variaram significativamente ( $P < 0,001$ ), onde os compostos fenólicos totais e os flavonoides totais variaram de 38 a 114 mg/g e de 18 a 30 mg/g, respectivamente. As catequinas individuais determinadas por HPLC variaram de 14 a 75 mg/g (EGCG), de 3,5 a 22,9 (ECG), de 5,7 a 18,4 mg/g (EC), e 1,9 a 6,7 mg/g (catequina). No trabalho realizado por Socha et al. (2013), os flavan-3-óis no chá branco mostraram resultados similares com o nosso estudo, variando de 1,2 a 2,5 mg/g (catequina), de 1,7 a 5,6 mg/g (EC), de 25 a 75 mg/g (EGCG), de 11,8 a 24,4 mg/g (ECG), e 5,9 a 8,4 mg/g (EGC). Nossos resultados mostraram também de acordo com o estudo realizado por Unachukwu et al. (2010) na avaliação do TPC e catequinas usando dois diferentes solventes (água e metanol) na extração dos fenólicos dos chás brancos. Wang et al. (2000) estabeleceram que o conteúdo de flavan-3-óis encontrado em chás não-fermentados são na seguinte ordem (-)-EGCG > (-)-EGC > (-)-EC > (-)-ECG > (+)-C.

**Tabela 4.1** Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante dos extratos de chá branco.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	DPPH (mmol TE/g)	ABTS (mmol TE/g)	FRAP (mmol TE/g)	ORAC (mmol TE/g)
1	5 (-1)	30 (-1)	20 (0)	37,57 ± 2,08	18,01 ± 0,13	759,19 ± 37,76	1116,69 ± 12,50	588,51 ± 10,01	1544,55 ± 47,54
2	15 (1)	30 (-1)	20 (0)	59,45 ± 1,15	21,80 ± 0,52	844,37 ± 28,00	1427,14 ± 6,44	720,10 ± 16,37	1756,26 ± 96,16
3	5 (-1)	70 (1)	20 (0)	83,04 ± 1,36	27,38 ± 0,26	990,77 ± 19,16	1606,59 ± 11,71	917,33 ± 13,56	2107,26 ± 116,45
4	15 (1)	70 (1)	20 (0)	96,62 ± 2,91	29,78 ± 0,58	1005,02 ± 26,27	1577,72 ± 12,50	927,40 ± 23,55	2013,78 ± 79,88
5	5 (-1)	50 (0)	10 (-1)	72,55 ± 3,28	20,49 ± 0,38	850,43 ± 18,67	1340,50 ± 12,88	726,01 ± 5,74	1484,51 ± 20,66
6	15 (1)	50 (0)	10 (-1)	84,02 ± 1,29	22,46 ± 0,61	858,92 ± 21,73	1341,53 ± 5,36	755,52 ± 14,09	1694,87 ± 51,06
7	5 (-1)	50 (0)	30 (1)	94,51 ± 2,64	26,59 ± 0,62	934,09 ± 27,19	1459,11 ± 18,82	846,84 ± 19,94	1894,11 ± 37,70
8	15 (1)	50 (0)	30 (1)	100,12 ± 1,29	29,61 ± 0,30	1013,20 ± 14,39	1413,73 ± 6,44	996,15 ± 21,14	2087,93 ± 99,28
9	10 (0)	30 (-1)	10 (-1)	71,49 ± 1,66	17,74 ± 0,28	735,25 ± 8,08	1042,44 ± 21,06	730,17 ± 13,59	1548,86 ± 134,98

10	10 (0)	70 (1)	10 (-1)	95,00 ± 1,12	21,24 ± 0,07	885,59 ± 26,70	1595,25 ± 19,32	951,01 ± 12,86	1947,48 ± 175,51
11	10 (0)	30 (-1)	30 (1)	76,94 ± 2,00	18,46 ± 0,40	832,24 ± 9,81	1401,35 ± 25,01	883,65 ± 8,90	1745,04 ± 127,27
12	10 (0)	70 (1)	30 (1)	106,95 ± 2,58	26,98 ± 0,45	1028,96 ± 18,57	1499,33 ± 8,19	981,56 ± 10,05	2100,25 ± 100,33
13	10 (0)	50 (0)	20 (0)	97,93 ± 1,71	21,19 ± 0,72	922,57 ± 14,12	1533,37 ± 8,19	907,95 ± 12,60	1993,16 ± 112,99
14	10 (0)	50 (0)	20 (0)	106,87 ± 2,49	21,98 ± 0,25	948,03 ± 8,33	1571,53 ± 4,73	927,05 ± 17,72	1933,08 ± 117,71
15	10 (0)	50 (0)	20 (0)	114,27 ± 1,60	21,19 ± 0,43	929,85 ± 12,30	1484,89 ± 11,71	922,53 ± 26,73	2035,61 ± 9,85
*P (Hartley)				0,97	0,59	0,82	0,64	0,94	0,28
**P (one-way ANOVA)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Resultados expressos como media ± desvio padrão. \* Valores de probabilidade obtidos pelo teste de Hartley (*F*-max) para a homogeneidade de variâncias, \*\* valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA.



**Tabela 4.2** LC-DAD dos extratos de chá branco.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	(+)-Catequina (mg/g)	(-)-Epicatequina (mg/g)	EGCG (mg/g)	ECG (mg/g)
1	5 (-1)	30 (-1)	20 (0)	2,23 ± 0,24	6,34 ± 1,07	13,45 ± 0,40	3,49 ± 0,62
2	15 (1)	30 (-1)	20 (0)	2,46 ± 0,15	6,67 ± 0,71	19,19 ± 1,41	5,50 ± 0,71
3	5 (-1)	70 (1)	20 (0)	3,89 ± 0,02	10,26 ± 1,02	55,23 ± 0,96	11,61 ± 0,09
4	15 (1)	70 (1)	20 (0)	4,39 ± 0,17	9,23 ± 0,42	43,53 ± 2,31	13,45 ± 0,11
5	5 (-1)	50 (0)	10 (-1)	3,71 ± 0,18	10,35 ± 0,24	33,39 ± 1,82	8,49 ± 0,03
6	15 (1)	50 (0)	10 (-1)	2,47 ± 0,20	7,36 ± 0,11	24,18 ± 0,25	6,61 ± 0,09
7	5 (-1)	50 (0)	30 (1)	3,83 ± 0,45	11,62 ± 0,46	40,22 ± 2,43	11,94 ± 0,74
8	15 (1)	50 (0)	30 (1)	5,67 ± 0,39	15,01 ± 1,73	58,96 ± 3,14	18,39 ± 0,31
9	10 (0)	30 (-1)	10 (-1)	1,93 ± 0,01	5,71 ± 0,56	14,67 ± 0,48	3,89 ± 0,16
10	10 (0)	70 (1)	10 (-1)	2,80 ± 0,13	7,67 ± 0,35	30,22 ± 1,44	8,81 ± 0,38
11	10 (0)	30 (-1)	30 (1)	4,28 ± 0,31	12,02 ± 1,00	42,16 ± 0,84	12,16 ± 0,70
12	10 (0)	70 (1)	30 (1)	6,68 ± 0,10	18,36 ± 0,44	68,46 ± 8,62	22,85 ± 0,05
13	10 (0)	50 (0)	20 (0)	5,85 ± 0,23	15,69 ± 0,51	52,49 ± 5,96	16,69 ± 0,51
14	10 (0)	50 (0)	20 (0)	6,05 ± 0,38	13,83 ± 1,40	53,46 ± 1,41	15,16 ± 0,79
15	10 (0)	50 (0)	20 (0)	5,71 ± 0,39	13,18 ± 0,36	45,14 ± 1,21	12,67 ± 0,10
*P (Hartley)				0,61	0,85	0,25	0,36
**P (one-way ANOVA)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão. EGC (-)-epigallocatequina galato, ECG: (-)-epicatequina galato. \* Valor de probabilidade obtido pelo teste de Hartley (*F*-max) para homogeneidade de variâncias, \*\* valore de probabilidade obtido por *one-way* ANOVA.

A atividade antioxidante mostrou uma grande variação entre os ensaios usados: o DPPH variaram de 735 a 1029 mmol/g, ABTS de 1042 a 1607 mmol/g, FRAP de 589 a 996 mmol/g e ORAC de 1485 a 2107 mmol/g (Tabela 1). A variação entre os resultados encontrados para a atividade antioxidante *in vitro* é devido aos diferentes mecanismos que estão envolvidos na determinação. Os radicais cátions de DPPH e ABTS são dois estáveis e radicais livres coloridos, no qual uma solução reatante é misturada com o extrato de chá que pode doar um átomo de hidrogênio, e a forma reduzida do radical é gerada seguida pela perda de cor (ALI et al., 2008). Por outro lado, o FRAP é caracterizado pela habilidade de transferência de elétrons, que resulta na redução dos íons ferros na presença dos compostos antioxidantes (CRAFT et al., 2012). Por último, o teste de ORAC avalia a habilidade dos compostos antioxidantes em inibir o consumo da molécula alvo mediante o radical peroxil (por exemplo, AAPH) (LÓPEZ-ALARCÓN, DENICOLA, 2013).

Usando a correlação de Pearson, foi possível verificar que os compostos fenólicos totais e flavonoides totais tem uma correlação significativa ( $P < 0,03$ ) com a medida atividade antioxidante por DPPH ( $r = 0,761$ ;  $r = 0,879$ , respectivamente), ABTS ( $r = 0,682$ ;  $r = 0,567$ , respectivamente), FRAP ( $r = 0,884$ ;  $r = 0,607$ , respectivamente), e ORAC ( $r = 0,772$ ;  $r = 0,724$ , respectivamente). Uma correlação significativa ( $P < 0,01$ ) também foi observada entre todos os métodos antioxidantes avaliados mostrando um coeficiente de correlação maior que  $r > 0,77$ . Os flavan-3-óis destacaram como os principais compostos com o poder antioxidante em chás, com seu poder antioxidante sendo relacionada à presença dos grupos galoil e hidroxil na sua estrutura (ARON; KENNEDY, 2008). De acordo com o nosso estudo, todas as catequinas individuais mostraram correlação significativa ( $P < 0,03$ ) com os ensaios antioxidantes *in vitro*, com a exceção da epicatequina que não foram correlacionados com o ABTS ( $r = 0,497$ ,  $P = 0,06$ ).

### 3.2 Regressão linear múltipla acoplada a RSM

Com o objetivo de encontrar as melhores condições para realizar uma extração adequada, a metodologia de superfície de resposta acoplada com a análise de regressão múltipla tem sido usada. Bae et al. (2015) usaram um planejamento composto central (CCD) com 5 níveis e 3 fatores e RSM para obter as melhores condições de extração para diferentes tipos de chás (verde, oolong, preto, e mate) baseado no conteúdo de compostos fenólicos totais. Em um outro estudo com um principal objetivo, Ghoreishi e Heidari (2013) realizaram a otimização dos extratos de epigallocatequina-3-galato do chá verde por tecnologia de fluído

supercrítico usando planejamento rotacional composto central (CCDR) com quatro variáveis independentes.

De acordo com Granato et al. (2014), a regressão linear múltipla associado a RSM objetiva entender os dados obtidos por uma equação de forma que explica o fenômeno sobre a investigação. Portanto, todos os modelos propostos pela análise de regressão múltipla para as variáveis antioxidantes foram significativas ( $P < 0,001$ ), não apresentaram falta de ajuste ( $P > 0,05$ ) e pode explicar mais que 85% de toda a variância dos dados com um  $R^2$  ajustado  $> 0,80$ , com exceção para o ORAC ( $R^2 = 0,7364$  e  $R^2_{Adj} = 0,6924$ ) (Tabela 3). Em relação aos efeitos dos modelos, todos os efeitos lineares contribuíram positivamente e significativamente ( $P < 0,05$ ) na extração, enquanto que os coeficientes de regressão quadráticos e a interação entre os coeficientes linear vs. linear ou quadrático vs. linear variaram de acordo com as variáveis estudadas. Por exemplo, a atividade antioxidante pelo método ABTS, o coeficiente de regressão quadrático da concentração de etanol ( $X_3$ ), interações do tempo ( $X_1$ ) vs. temperatura ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_2$ ) vs. concentrações de etanol ( $X_3$ ) mostraram um efeito negativo significativo na extração. Os efeitos dos parâmetros nas variáveis dependentes são mostrados nos gráficos de superfície de resposta 3-D (Figura 1A-J) com função do tempo e temperatura.

De acordo com Spigno, Tramelli, e De Faveri (2007), o tempo e a temperatura são importantes para minimizar os custos de energia do processo. Além disso, a temperatura aumenta a solubilidade do soluto e o coeficiente de difusão. Por outro lado, é inevitável que um intenso aumento na temperatura possa causar a perda dos compostos fenólicos. A polaridade desempenha um importante papel na extração dos compostos fenólicos de plantas. Os solventes alcoólicos estão entre os solventes comumente usados. De fato, álcoois e solventes polares extraem flavonoides e taninos de plantas (DAI; MUMPER, 2010). De acordo com Spigno et al. (2007) as misturas entre água e álcoois tem sido mais eficiente na extração de compostos fenólicos em comparação ao sistema mono-componente de solvente. Metanol e etanol são os principais álcoois usados na extração embora etanol tenha vantagens quanto a sua segurança ao consumo humano.

Outros estudos têm mostrado os efeitos destas ou outras variáveis na extração dos compostos bioativos. Alberti et al. (2014) no seu estudo envolvendo a extração de compostos fenólicos da maçã foram capaz de verificar que a condição do processo, assim como o tipo de solvente e a concentração influenciam significativamente nos níveis de compostos extraídos. Usando extração assistida por ultrassom, Yan et al. (2011) observaram o efeito da razão de água e material (soluto/solvente), tempo de extração e temperatura de extração na extração de polissacarídeos da *Tremella mesentérica*.

**Tabela 4.3** Efeito das variáveis independentes (tempo, temperatura, e concentração de etanol) para as diferentes variáveis avaliadas.

Variável resposta	Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	valor de $t$	$p$ -valor	-95% confiança	+ 95% confiança
Compostos	<i>Constante</i>	106,32	3,09	34,42	<0,001	99,33	113,30
fenólicos totais (mg/g)	$x_1$	6,57	2,27	2,89	0,02	1,43	11,71
	$x_1^2$	-18,49	3,34	-5,54	<0,001	-26,03	-10,94
	$x_2$	17,02	2,27	7,49	<0,001	11,88	22,16
	$x_2^2$	-18,69	3,34	-5,60	<0,001	-26,24	-11,14
	$x_3$	6,93	2,27	3,05	0,01	1,79	12,08
	$R^2$	0,9360					
	$R^2$ ajustado	0,9005					
	$P$ -valor (modelo)	<0,001					
	$P$ -valor (lack-of-fit)	0,79					
Flavonoides totais	<i>Constante</i>	21,25	0,50	42,16	<0,001	20,13	22,38
(mg/g)	$x_1$	1,40	0,47	2,96	0,01	0,35	2,45
	$x_1^2$	3,26	0,69	4,73	<0,001	1,73	4,80
	$x_2$	3,67	0,47	7,78	<0,001	2,62	4,72
	$x_3$	2,46	0,47	5,22	<0,001	1,41	3,51
	$R^2$	0,9225					
	$R^2$ ajustado	0,8914					
	$P$ -valor (modelo)	<0,001					

	<i>P-valor (lack-of-fit)</i>	0,09					
DPPH (mmol/g)	<i>Constante</i>	922,44	9,27	99,47196	<0,001	901,7793	943,104
	$x_1$	23,38	8,67	2,69499	0,02	4,0497	42,7055
	$x_2$	92,41	8,67	10,65329	<0,001	73,0836	111,7394
	$x_2^2$	-37,27	12,70	-2,93482	0,02	-65,5598	-8,9735
	$x_3$	59,79	8,68	6,89253	<0,001	40,4611	79,1169
	$R^2$	0,9465					
	$R^2$ ajustado	0,9251					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
	<i>P-valor (lack-of-fit)</i>	0,21					
ABTS (mmol/g)	<i>Constante</i>	1473,99	25,74	57,26	<0,001	1415,76	1532,22
	$x_2$	161,41	24,08	6,70	<0,001	106,94	215,88
	$x_3$	56,73	24,08	2,36	0,04	2,25	111,20
	$x_3^2$	-87,34	35,25	-2,48	0,04	-167,07	-7,60
	$x_1x_2$	-84,83	34,05	-2,49	0,03	-161,87	-7,80
	$x_2x_3$	-113,71	34,05	-3,34	0,01	-190,74	-36,67
	$R^2$	0,8915					
	$R^2$ ajustado	0,8313					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
	<i>P-valor (lack-of-fit)</i>	0,28					
FRAP (mmol/g)	<i>Constant</i>	922,32	5,20	177,48	<0,001	907,89	936,75

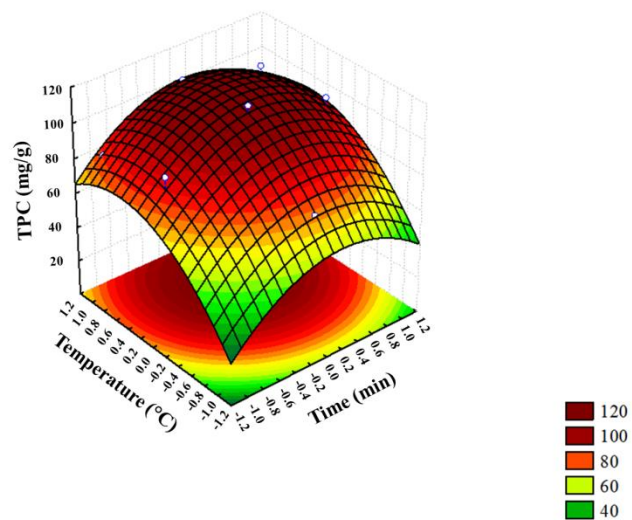
	$x_1$	40,06	3,82	10,47	<0,001	29,44	50,68
	$x_1^2$	-93,55	5,61	-16,67	<0,001	-109,13	-77,97
	$x_2$	79,69	5,41	14,73	<0,001	64,67	94,70
	$x_2^2$	-38,08	5,61	-6,78	<0,001	-53,67	-22,50
	$x_3$	46,01	5,41	8,51	<0,001	30,99	61,02
	$x_1x_2$	-30,38	5,41	-5,62	<0,001	-45,40	-15,36
	$x_1^2x_2$	54,34	7,65	7,10	<0,001	33,10	75,58
	$x_1x_3$	29,95	5,41	5,54	0,01	14,93	44,97
	$x_1^2x_3$	44,36	7,65	5,80	<0,001	23,12	65,60
	$x_2x_3$	-30,73	5,41	-5,68	<0,001	-45,75	-15,71
	$R^2$	0,9977					
	$R^2$ ajustado	0,9918					
	$P$ -valor (modelo)	<0,001					
	$P$ -valor (lack-of-fit)	0,43					
ORAC (mmol/g)	<i>Constante</i>	1859,12	30,75	60,45	<0,001	1792,11	1926,13
	$x_2$	196,76	42,11	4,67	<0,001	105,00	288,51
	$x_3$	143,95	42,11	3,42	0,01	52,20	235,70
	$R^2$	0,7364					
	$R^2$ ajustado	0,6924					
	$P$ -valor (modelo)	<0,01					
	$P$ -valor (lack-of-fit)	0,15					

EGCG (mg/g)	<i>Constante</i>	51,60	3,31	15,578	<0,001	44,22	58,985
	$x_1^2$	-11,55	3,58	-3,228	0,01	-19,52	-3,577
	$x_2$	12,36	2,44	5,069	<0,001	6,93	17,791
	$x_2^2$	-10,55	3,58	-2,948	0,02	-18,52	-2,578
	$x_3$	14,72	2,44	6,036	<0,001	9,28	20,148
	$R^2$	0,8889					
	$R^2$ ajustado	0,8444					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
	<i>P-valor (lack-of-fit)</i>	0,56					
ECG (mg/g)	<i>Constant</i>	14,82	1,07	13,91	<0,001	12,45	17,19
	$x_1^2$	-3,45	1,15	-2,99	0,01	-6,01	-0,88
	$x_2$	3,96	0,78	5,05	<0,001	2,21	5,71
	$x_2^2$	-2,88	1,15	-2,50	0,03	-5,44	-0,31
	$x_3$	4,69	0,78	5,98	<0,001	2,95	6,44
	$R^2$	0,8831					
	$R^2$ ajustado	0,8364					
	<i>P-valor (modelo)</i>	<0,001					
	<i>P-valor (lack-of-fit)</i>	0,52					
EC (mg/g)	<i>Constante</i>	14,13	0,80	17,69	<0,001	12,35	15,91
	$x_1^2$	-2,97	0,86	-3,44	0,01	-4,89	-1,05
	$x_2$	1,85	0,59	3,15	0,01	0,54	3,16

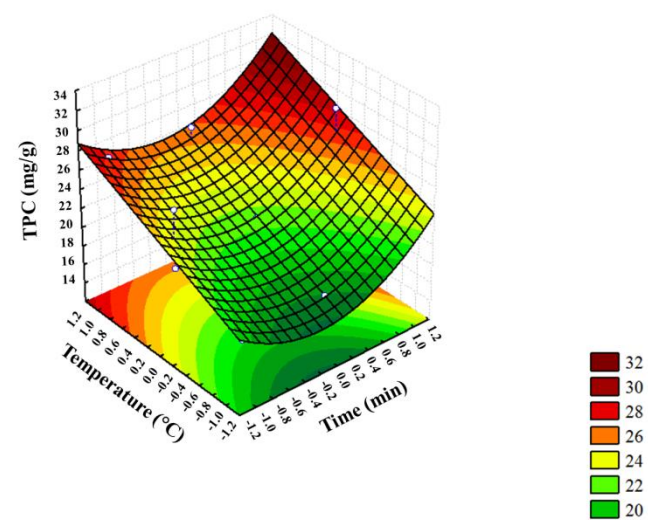
	$x_2^2$	-3,11	0,86	-3,61	0,01	-5,04	-1,19
	$x_3$	3,24	0,59	5,51	<0,001	1,93	4,55
	$R^2$	0,8639					
	$R^2$ ajustado	0,8095					
	$P$ -valor (modelo)	<0,001					
	$P$ -valor (lack-of-fit)	0,41					
Catechin (mg/g)	Constante	5,48	0,297	18,46	<0,001	4,81	6,150
	$x_1^2$	-1,27	0,320	-3,95	0,01	-1,99	-0,541
	$x_2$	0,86	0,218	3,93	0,01	0,36	1,351
	$x_2^2$	-1,26	0,320	-3,94	0,01	-1,99	-0,537
	$x_3$	1,19	0,218	5,46	<0,001	0,70	1,686
	$x_1x_3$	0,77	0,309	2,50	0,03	0,07	1,471
	$R^2$	0,8995					
	$R^2$ ajustado	0,8436					
	$P$ -valor (modelo)	<0,001					
	$P$ -valor (lack-of-fit)	0,06					



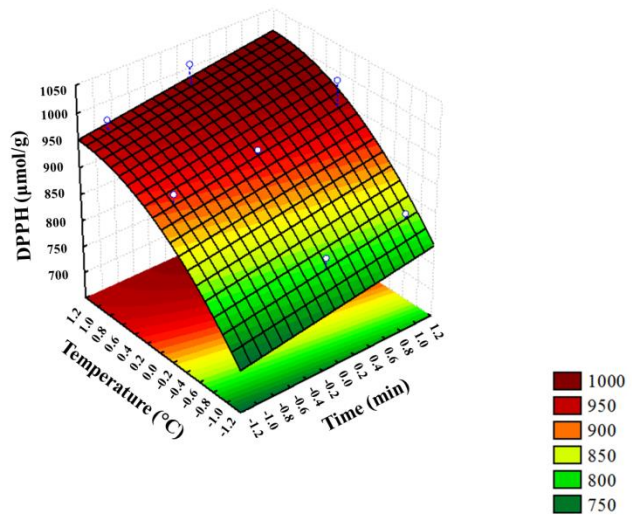
(A) Compostos fenólicos totais



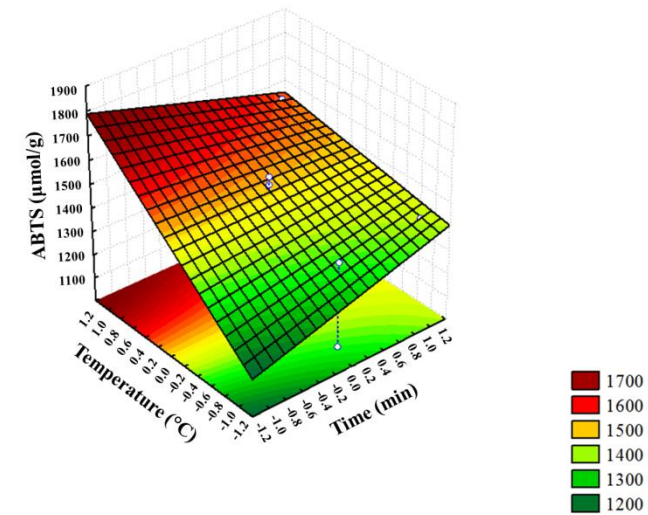
(B) Flavonoides totais



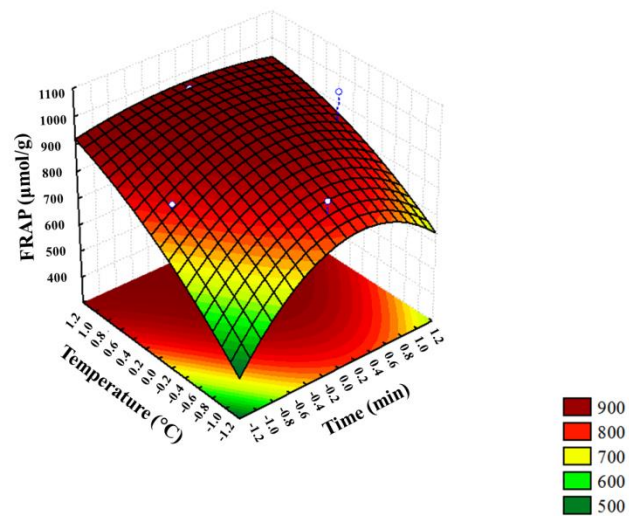
(C) DPPH



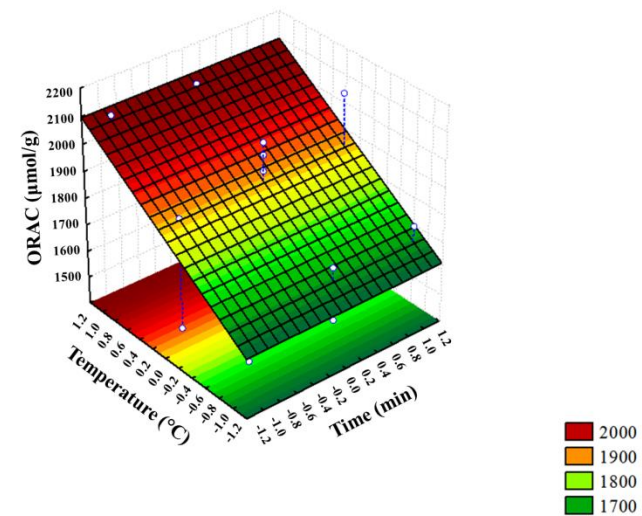
(D) ABTS



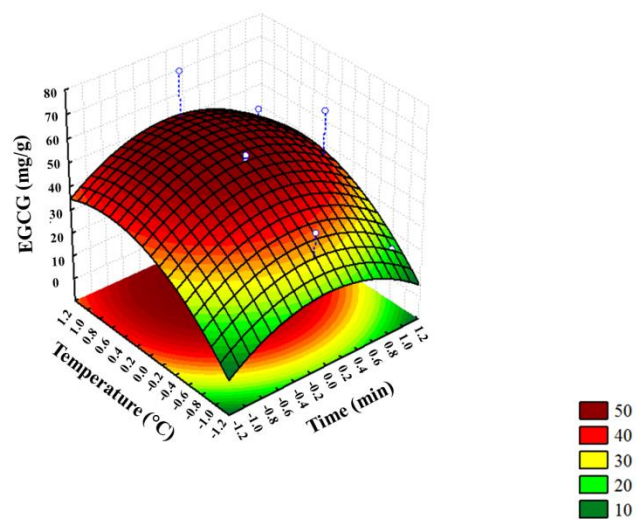
(E) FRAP



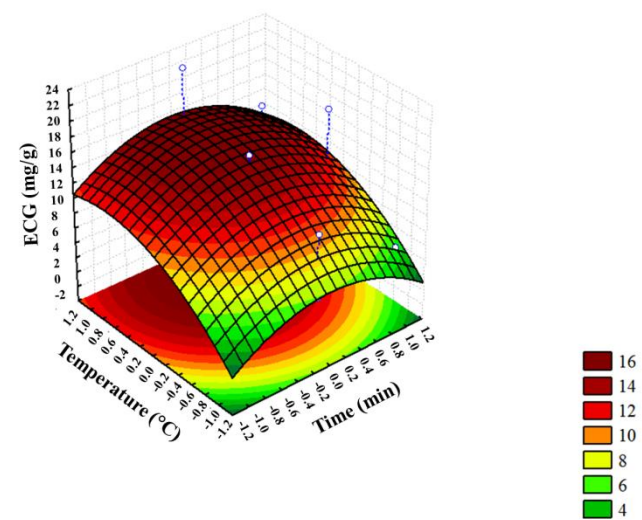
(F) ORAC



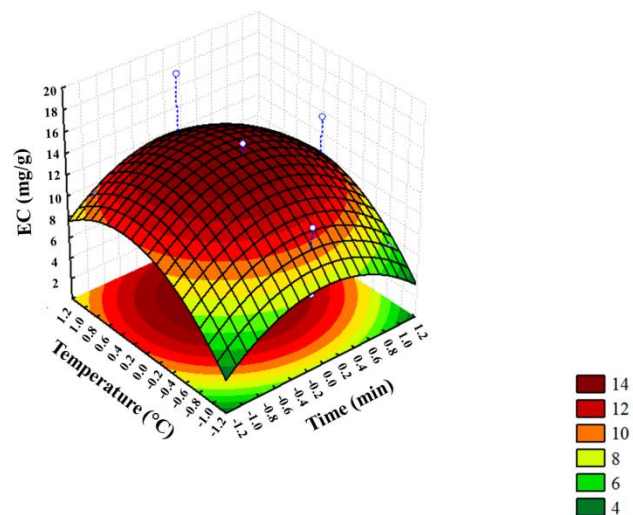
(G) EGCG



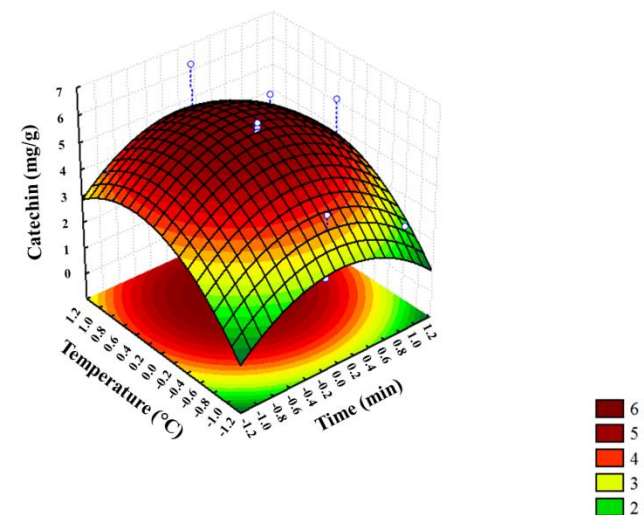
(H) ECG



(I) EC



(J) Catequina



**Figura 4.1** Gráficos da superfícies de resposta dos efeitos da temperatura, tempo e concentração de etanol.

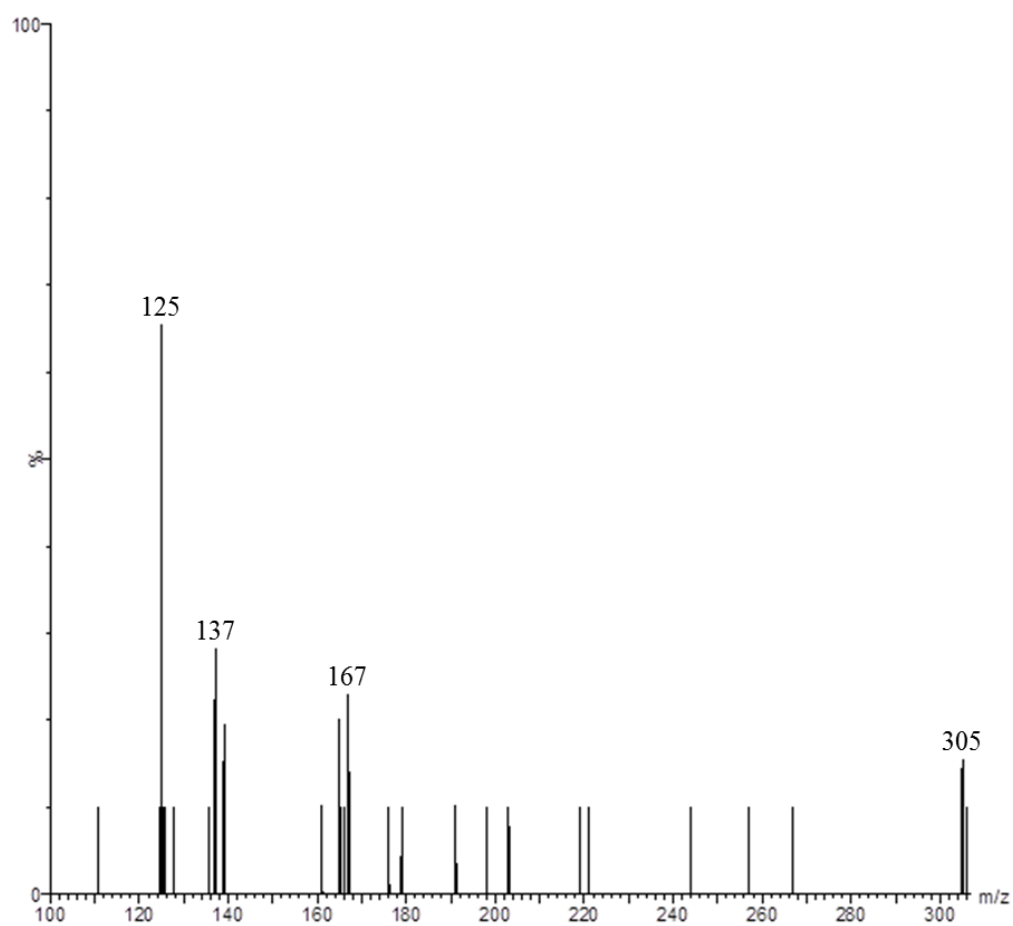
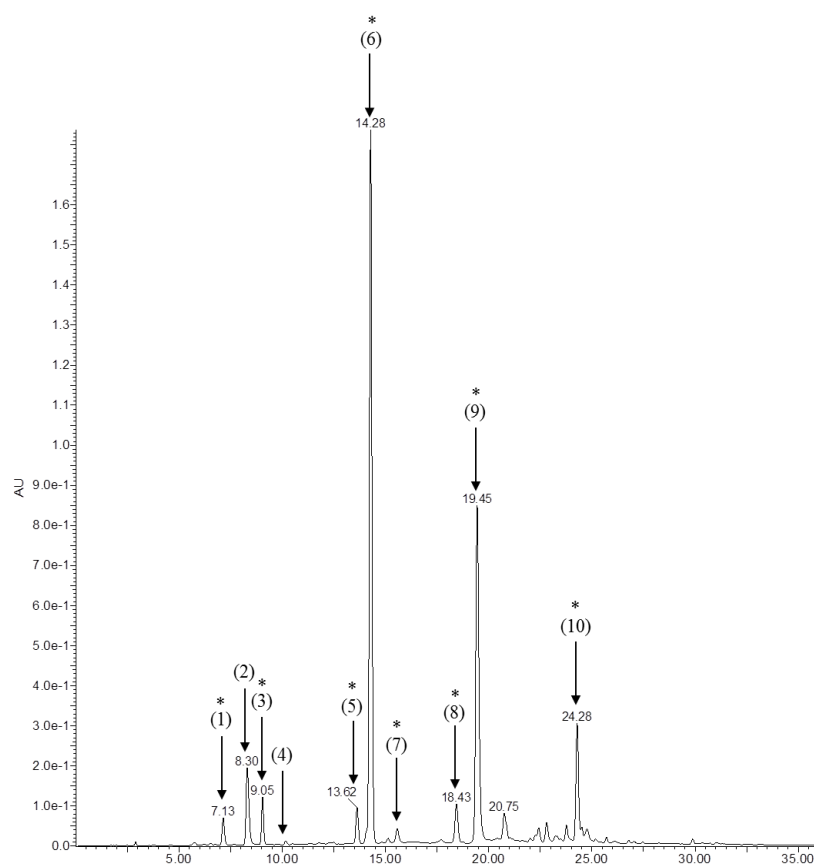
### 3.3 Otimização e verificação dos modelos preditivos

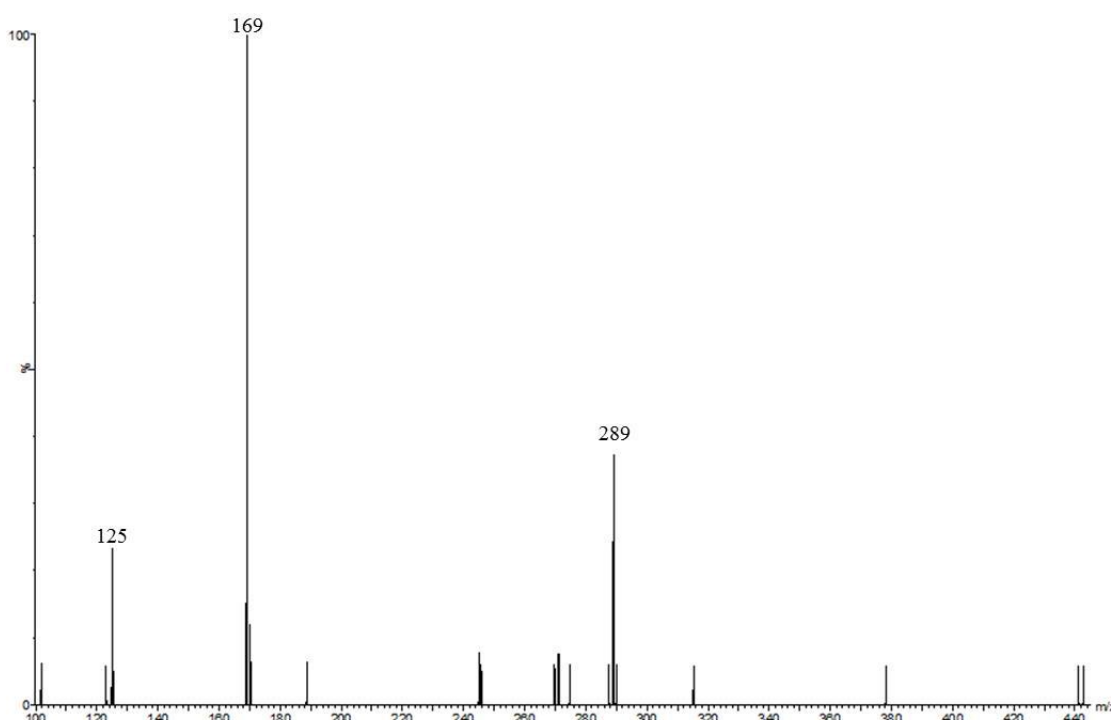
Depois de modelar a extração dos compostos fenólicos do chá branco, um procedimento de otimização multi-resposta usando a função de desejabilidade (D) foi conduzido com os modelos de maneira a maximizar a atividade antioxidante e os compostos individuais medidos por HPLC. A condição ótima para esta otimização foi sugerida com um  $d = 0,9611$ , no qual significa que 96% do objetivo proposto foi encontrado pela otimização na extração com 30% de etanol por 10 min a 66 °C. Com o propósito de verificar a condição ótima, uma validação externa foi realizada, e os valores observados e preditos com os erros absolutos computados (AE) na extração foram: DPPH (mmol/g) (observado:  $994,10 \pm 5,36$ , predito: 1032,31, AE = 3,84 %), ABTS (mmol/g) (observado:  $1582,55 \pm 17,78$ , predito: 1481,54, AE = 6,38%), FRAP (mmol/g) (observado:  $964,10 \pm 11,24$ , predito: 983,12, AE = 1,96%), EGCG (mg/g) (observado:  $69,57 \pm 0,94$ , predito: 69,42, AE = 0,17%), e ECG (mg/g) (observado:  $20,47 \pm 0,02$ , predito: 20,84, AE = 1,82%). Todos os valores observados foram dentro dos intervalos preditos ao nível de 95%. Portanto, os modelos podem ser usados para prever os valores das respostas.

Devido ao interesse pelas indústrias e pelos consumidores em produtos suplementados com extratos de chás, a aplicação predominante de extrato de chá verde tem sido estudada em produtos cárneos, filmes ativos, óleos e gorduras, produtos panificáveis, etc. (SENANAYAKE, 2013). Portanto, nós gostaríamos de enfatizar que o chá branco assim como o chá verde pode ser um bom recurso para suplementar produtos alimentícios com compostos bioativos. Nossos futuros estudos devem focar na aplicação e avaliação dos extratos de chá branco em produtos alimentares e realizar comparação com outros extratos vegetais/chás em estudos relacionados.

### 3.4 Identificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-MS/MS nas condições ótimas

O perfil fenólico dos extratos foi identificado nas melhores condições em base de seu tempo de retenção, comprimento de onda e espectro de massa baseado nos valores da razão massa/carga e em comparação com os padrões de comparação. O cromatograma dos compostos fenólicos analisados é mostrado na Figura 2.





**Figura 4.2** Cromatogram do extrato de chá branco obtido no ponto ótimo (10 min, 66 °C, 30% de etanol) a 280 nm (A), espectro de massa para GC e EGC (B), e ECG (C). Nota: \*amostras identificadas e confirmadas usando padrão de referência.

Os ácidos fenólicos identificados no extrato de chá branco foram o ácido gálico (pico 1,  $t_R = 7,15$  min,  $\lambda_{MAX} = 271$  nm) e o ácido 5-galoilquínico (pico 2,  $t_R = 8,30$  min,  $\lambda_{MAX} = 274$  nm) no qual produziu os íons  $[M-H]^-$  a  $m/z$  169 e 343 e os fragmentos a  $m/z$  125 e 191 (somente para ácido 5-galoilquínico). Estes compostos têm sido relatados entre os principais ácidos fenólicos presentes em chás de *Camellia sinensis* (WU et al., 2012), e teobromina (pico 3,  $t_R = 9,05$  min,  $\lambda_{MAX} = 273$  nm) e cafeína (pico 6,  $t_R = 14,28$  min,  $\lambda_{MAX} = 273$  nm) como as principais metilxantinas (confirmados usando padrão de referência). De acordo com Pinto (2013), o consumo de chás tem sido associado com os efeitos positivos na pressão sanguínea, desempenho cognitivo, humor e no sono.

Galocatequina (pico 4,  $t_R = 10,17$  min,  $\lambda_{MAX} = 270$  nm) e epigalocatequina (pico 6,  $t_R = 19,45$  min,  $\lambda_{MAX} = 270$  nm) mostraram o íon  $[M-H]^-$  a  $m/z$  305 com os mesmos fragmentos a  $m/z$  167, 137, e 125 (Figura 2-B). Catequina (pico 7,  $t_R = 15,57$  min,  $\lambda_{MAX} = 278$  nm) e epicatequina (pico 8,  $t_R = 18,43$  min,  $\lambda_{MAX} = 278$  nm) também apresentaram o mesmo íon  $[M-H]^-$  a  $m/z$  289 e os mesmos fragmentos  $m/z$  109, 121, 191, 205, e 245. Epigalocatequina galato (pico 9,  $t_R = 19,45$  min,  $\lambda_{MAX} = 274$  nm) mostraram o íon  $[M-H]^-$  a  $m/z$  457 e os fragmento a

$m/z$  305, 169, e 125, enquanto epicatequina galato (pico 10,  $t_R = 24.28$  min,  $\lambda_{MAX} = 277$  nm) apresentou o íon  $[M-H]^-$  a  $m/z$  441 e os fragmentos a  $m/z$  289, 169, e 125 (Figura 2-C). A identificação dos compostos fenólicos (catequinas e ácidos fenólicos) foram de acordo com Del Rio et al. (2004) e Wu et al. (2012) onde identificaram os compostos fenólicos presentes no chá nos diferentes estágios de fermentação (não fermentado até completamente fermentado).

#### 4 CONCLUSÃO

Um planejamento Box-Behnken foi aplicado para avaliar as extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* do chá branco. Usando a metodologia de superfície de resposta acoplada a regressão múltipla foi possível sugerir os modelos matemáticos para avaliar as variáveis dependentes. Um otimização multi-resposta usando DPPH, ABTS, FRAP, EGCG, e ECG foi efetiva com 96% do objetivo proposto com as melhores condições das variáveis para o aumento do rendimento na extração, onde o ponto ótimo foi encontra a 10 min, 66 °C, e 30 % de etanol. Portanto, o extrato de chá branco pode ser um bom recurso de compostos bioativos (principalmente flavan-3-óis) para suplementar produtos alimentícios.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes espécies de chás brasileiros foram analisadas para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos, cor e atividade antioxidante. Através da análise de componentes principais e da análise hierárquica de agrupamentos foi possível verificar que os chás da espécie de *Camellia sinensis* apresentaram o maior conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Como o chá branco, o verde e o preto são os principais chás de *C. sinensis* consumidos no mundo, estes foram avaliados individualmente assim como suas misturas binárias e ternárias. O chá branco mostrou-se como o principal com os maiores teores de atividade antioxidante *in vitro* e de compostos fenólicos sendo EGCG e EGC os principais flavan-3-óis presentes. Através da metodologia de superfície de resposta (RSM) foi possível propor modelos de extração e qual o tipo de chá foi o que mais contribuiu na atividade antioxidante.

Por fim foi otimizado a extração dos compostos bioativos do chá branco, e um ponto ótimo de controle de extração de temperatura, tempo e concentração de etanol foi obtido. Os extratos vegetais, como chás, tem ganhado um interesse nos últimos anos pelas indústrias e pelos consumidores para preservar e suplementar alimentos.



## REFERÊNCIAS

- ABEYWICKRAMA, K. R. W.; RATNASOORIYA, W. D.; AMARAKOON, A. M. T. Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF) grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 278-286, 2011.
- ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DEBENEDETTI, S.; FRANCESCATO, L.; ROSELLA, M. A.; HENRIQUES, A. T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 147-153, 2012.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.
- ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1-15, 2008.
- ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55-63, 2008.
- AOSHIMA, H.; HIRATA, S.; AYABE, S. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. **Food Chemistry**, v. 103, p. 617-622, 2007.
- APAK, R.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413-419, 2008.
- APAK, R.; GUÇLU, K.; DEMIRATA, B.; OZYUREK, M.; ÇELIK, S. E.; BEKTASOGLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496-1547, 2007.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 79-104, 2008.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

BAE, I. K.; HAM, H. M.; JEONG, M. H.; KIM, D. H.; KIM, H. J. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, 2015.

BANSAL, S.; CHOUDHARY, S.; SHARMA, M.; KUMAR, S. S.; LOHAN, S.; BHARDWAJ, V.; SYAN, N.; JYOTI, S. Tea: A native source of antimicrobial agents. **Food Research International**, v. 53, p. 568-584, 2013.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836-845, 2007.

BASSANI, D. C.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 923-934, 2014.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T.; STRAIN, J. J.; TOMLINSON, B. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. **Nutrition and Cancer**, v. 34, p. 83-87, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; RIBANI, R. H. Chemical composition and antioxidant activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguensis* A.St.-Hil.,

Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523-5527, 2011.

BORSATO, A. V.; FILHO, L. D.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] submetida à secagem à 70°C. **Semina: Ciência Agrárias**, v. 28, p. 635-644, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 277 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 fev. 2014.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BROADHURS, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic properties of green tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, p. 25-29, 2005.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184. 2004.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; CIRIC, A.; BARREIRA, J. C. M.; SOKOVIC, M.; OLIVEIRA, B. P. P.; BUELGA, C. S.; FERREIRA, I. C. R. Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 114-124, 2015.

CARLONI, P.; TIANO, L.; PADELLA, L.; BACCHETTI, T.; CUSTOMU, C.; KAY, A.; DAMIANI, E. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same cultivar. **Food Research International**, v. 53, p. 900-908, 2013.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; CHEW, Y. L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1214-1222, 2007.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; CHONG, J. B. L.; TAN, S. K.; WONG, S. K. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 185-189, 2010.

CHAN, E. W. C.; SOH, W. Y.; TIE, P. P.; LAW, Y. P. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 4, p. 266-272, 2011.

CHAUDHURI, A. K. N.; KARMAKAR, S.; ROY, D.; PAL, S.; PAL, M.; SEN, T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (Sikkim variety). **Pharmacological Research**, v. 51, p. 169-175, 2005.

CORNISH, R. **Statistics: Cluster analysis**. Mathematics Learning Support Centre. 2007.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148-173, 2012.

CRUZ, A. G.; SOUZA, S. S.; CELEGHINI, M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S.; FARIA, J. A. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: a chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 124, p. 692-695, 2011.

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p. 107-113, 2002.

DAI, J.; MUMPER, R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DAMIANI, E.; BACCHETTI, T.; PADELLA, L.; TIANO, L.; CARLONI, P. Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 59-66, 2014.

DE GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. T.; RIBANI, R. H.; DOS SANTOS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, p. 801-807, 2013.

DEETAE, P.; PARICHANON, P.; TRAKUNLEEWATTHANA, P.; CHANSEETIS, C.; LERTSIRI, S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. **Food Chemistry**, v. 133, p. 953-959, 2012.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; MULLEN, W.; BURNS, J.; LEAN, M. E. J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. HPLC-MS<sup>n</sup> analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2807-2815, 2004.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 545-551, 2006.

EL-BESHBISHY, H. A.; TORK, O. M.; EL-BAB, M. F.; AUTIFI, M. A. Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. **Pathophysiology**, v. 18, p. 125-135, 2011.

ENGEL, J.; GERRETZEN, J.; SZYMAN, E.; JANSEN, J. J.; DOWNEY, G.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C. Breaking with trends in preprocessing? **Trends Analytical Chemistry**, v. 50, p. 96-106, 2013.

FAOSTAT (2015). FAO Statistical Database. Acessado em Novembro de 2015. <http://http://faostat3.fao.org>.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: na alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.

FIGUEIRINHA, A.; PARANHOS, A.; ALONSO, J. J. P.; BUELGA, C. S.; BATISTA, M. T. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and na approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 718-728, 2008.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3275-3284, 2003.

FRIEDMAN, M.; KIM, S. Y.; LEE, S. J.; HAN, G. P.; HAN, J. S.; LEE, K. R.; KOZUKUE, N. Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. **Journal of Food Science**, v. 70, p. C550-C559, 2005.

GHOREISHI, S. M.; HEIDARI, E. Extraction of epigallocatechin-3-gallate from green tea via supercritical fluid technology: neural network modeling and response surface optimization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 128-136, 2013.

GIACOMINO, A.; ABOLLINO, O.; MALANDRINO, M.; MENTASTI, E. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: a review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p.122-39, 2011.

GIÃO, M. S.; SANJOSÉ, M. L. G.; PÉREZ, M. D. R.; PEREIRA, C. I.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2638-2647, 2007.

GORJANOVIC, S.; KOMES, D.; PASTOR, F.; BELSCAK-CVITANOVIC, A.; PEZO L.; HECIMOCIV, I.; SUZNJEVIC, D. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: Polarographic assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9573-9580, 2012.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GRANATO, D., BRANCO, G. F., CRUZ, A. G., FARIA, J. A. F. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 563-571, 2011.

GRANATO, D.; GRAVINK, R.; ZIELINSKI, A. A. F.; NUNES, D. S.; VAN RUTH, S. M. (2014). Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10283-10296, 2014.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Phenolic composition of South-American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price, and sensory quality. **Food Chemistry**, 129, 366-373, 2011.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Characterization of red wines from South America based on sensory properties and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 526-533, 2012.

GRANATO, D.; OLIVEIRA, C. C.; CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. Feasibility of different chemometric techniques to differentiate comercial Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers. **Food Research International**, v. 60, p. 212-217, 2014.

GULÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

GULÇİN, I.; OKTAY, M.; KIREÇCI E.; KUFREVIOGLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

HABER, L. L.; LUZ, J. M. Q.; DÓRO, L. F. A.; SANTOS, J. E. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha piperita* e *Melissa officinalis*. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 1006-1009, 2005.

HASIMOTO, T.; GOTO, M.; SAKAKIBARA, H.; OI, N.; OKAMOTO, M.; KANAZAWA, K. Yellow tea is more potent than other types of tea in suppressing liver toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 668-670, 2007.

HECK, C. I.; MEIJA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. R138-R151, 2007.

HILAL, Y.; ENGELHARDT, U. Characterisation of white tea - Comparison to green and black tea. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 2, p. 414-421, 2007.



HO, S. C.; WU, S. P.; LIN, S. M.; TANG, Y. L. Comparaison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chemistry**, v. 122, p. 768-774, 2010.

HORZIC,D.; KOMES, DRAZENKA, K.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; IVEKOVIC, D.; KARLOVIC, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 441-448, 2009.

HOSSAIN, M. B.; PATRAS, A.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**,v. 3, p. 179-189, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

KARA, D. Evaluarion of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal componente analysis. **Food Chemistry**, v. 114, p. 347-354, 2009.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, p. 550-557, 2006.

KAZIMIERCZAK, R.; HALLMANN, E.; RUSACZONEK, A.; REMBIALKOWSKA, E. Polyphenols, tannins and caffeine content and antioxidant activity of green teas coming from organic and non-organic production. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 30, p. 263-269, 2015.

KHOKHAR, S.; MAGNUSDOTTIR, S. G. M. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 565-570, 2002.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

KRIS-ETHERTON, P. M.; KEEN, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, p. 41-49, 2002.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, A.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 121-126, 1994.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 65-72, 2010.

LEENEN, R.; ROODENBURG, A. J. C.; TIJBURG, L. B. M.; WISEMAN, S. A. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 87-92, 2000.

LIANG, Y.; ZHANG, L.; LU, J. A study on chemical estimation of pu-erh tea quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 381-390, 2005.

LIN, S. D.; LIU, E. H.; MAU, J. L. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1616-1623, 2008.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and

total polyphenol content from *Trichiliacatigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57-60, 2012.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

MARAN, J. P.; MANIKANDAN, S.; PRIYA, B.; GURUMOORTHY, P. Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. **Journal of Food Science and Technology**, 2013. doi:10.1007/s13197-013-0985-z

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centelha (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.

MENDEL, S.; YODIM, M. B. Catechin polyphenols: Neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 304-317, 2004.

MOOI, E.; MARKO, S. **A concise guide to market research. The process, data, and methods using IBM SPSS statistics**. Berlin, DE: Springer, 2011, Cap. 9, 237-284.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, v. 1698s-1702s, 2000.

OH, J.; JO, H.; CHO, A. R.; KIM, S. J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, p. 403-409, 2013.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; DOWNEY, G.; RAWSON, A.; WARRINER, K.; GERNIGON, G. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 250-256, 2011.

PINTO, M. S. Tea: A new perspective on health benefits. **Food Research International**, v. 53, p. 558-567, 2013.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J., E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1190-1195, 2005.

QIN, Z.; PANG, X.; CHEN, D.; CHENG, H.; HU, X.; WU, J. Evaluation of Chinese tea by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry **Food Research International**, v. 53, p. 864-874, 2013.

QUEZADA, N.; ASECIO, M.; DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M.; GÓMES, B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. **Journal of Food Science**, v. 69, p. C371-C376.

RAAL, A.; ORAV, A.; PÜSSA, T.; VALNER, C.; MALMISTE, B.; ARAK, E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in comercial chamomile (*Chamomila recutita* L. Rauschert) teas from different countries. **Food Chemistry**, v. 131, p. 632-638, 2012.

RANILLA, L. G.; KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for

hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4676-4689, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Peppermint antioxidants revisited. **Food Chemistry**, v. 176, p. 72-81, 2015.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3285S-3292S, 2003.

RODRIGUES, V. C.; SILVA, M. V.; SANTOS, A. R.; ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2038-2045, 2015.

RUIZ, A. L. T.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, J. E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, p. 852-858, 2008.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguensis* A. St.-Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, p. 1233-1236, 2006.

SENANAYAKE, S. P. J. N. Green tea extract: chemistry, antioxidant properties and food applications – a review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1529-1541, 2013.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2004, p. 558.

SHARANGI, A. B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, p. 529-535, 2009.

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 29, p. 1-6, 1991.

SIMIRGIOTIS, M. J.; HIRSCHMANN, G. S. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 443-449, 2010.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOCHA, R.; BACZKOWICZ, M.; FORTUNA, T.; KURA, A.; LABANOWSKA, M.; KURDZIEL, M. Determination of free radicals and flavan-3-ols content in fermented and unfermented teas and properties of their infusions. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 167-177, 2013.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

SOUZA, J. R. P.; TAKAHASHI, L. S. A.; YOSHIDA, A. E.; GUIRAUD, M. C.; ROCHA, J. N. Tempo de armazenamento e temperatura na porcentagem e velocidade de germinação das sementes de camomila. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 982-986, 2007.

SOUZA, R. A. M.; OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; ALENCAR, S. M. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 29, p. 229-236, 2011.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200-208, 2007.

STATSOFT ELETRONIC STATISTICS BOOK. Discover which variables discriminate between groups, discriminant function analysis. Available at: <http://www.statsoft.com/textbook/discriminant-function-analysis/?button=1>. Accessed on 02 April 2013.

TAKAHASHI, L. S. A. T.; SOUZA, J. R. P.; YOSHIDA, A. E.; ROCHA, J.; N. Condições de armazenamento e tempo de embebição na germinação de sementes de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2009.

TAMBOSI, G.; ROGGE-RENNER, G. D. Avaliação de métodos de esterilização, concentração de ágar e composição de meio de cultura para propagação *in vitro* de *Pimpinella anisum* (Linn.) – Apiaceae. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 189-194, 2010.

TSAI, T. H.; TSAI, T. H.; CHIEN, Y. C.; LEE, C. W.; TSAI, P. J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry**, v. 10, p. 859-864, 2008.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4989-4995, 2005.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 29-40, 2003.

UNACHUKWU, U. J.; AHMED, S.; KAVALIER, A.; LYLES, J. T.; KENNELLY, E. J. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. **Journal of Food Science**, v. 75, p. C541-C548, 2010.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.-J.; MICHÈL, T. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 331-342, 1996.

VAQUERO, M. J. R.; SERRAVALLE, L. R. T.; DE NADRA, M. C. M.; DE SAAD, A. M. S. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control**, v. 21, p. 779-785, 2010.

VENDITTI, E.; BACCHETTI, T.; TIANO, L.; CARLONI, P.; GRECI, L.; DAMIANI, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? **Food Chemistry**, v. 119, p. 1597-1604, 2010.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, p. 115-121, 2000.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 152-160, 2000.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 34, p. 223-227, 2001.



WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, p. 115-121, 2000.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p. 109-130, 2001.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 1173-1183, 2001.

WU, C.; XU, H.; HÉRITIER, J.; ANDLAUER, W. Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. **Food Chemistry**, v. 132, p. 144-149, 2012.

YAN, Y. L.; YU, C. H.; CHEN, J.; LI, X.; LI, S. Q. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 217-224, 2011.

YANG, C. S.; WANG, X.; LU, G.; PICINICH, S. C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 429-439, 2009.

YI, T.; ZHU, L.; PENG, W. L.; HE, X. C.; CHEN, H. L.; LI, J.; YU, T.; LIANG, Z. T.; ZHAO, Z. Z.; CHEN, H. B. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, p. 194-201, 2015.

YOO, K. M. H.; WANG, I. K.; MOON, B. Comparative flavonoids contents of selected herbs and associations of their radical scavenging activity with antiproliferative actions in v79-4 cells. **Journal of Food Science**, v. 74, p. C419-C425, 2009.

ZHAO, Y.; CHEN, P.; LIN, L.; HARNLY, J. M.; YU, L.; LI, Z. Tentative identification, quantification, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1269-1277, 2011.

ZIELINSKI, A. A. F.; GRANATO, D.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; HAMINIUK, C. W. I. Modelling the extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6966-6977, 2015.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; van RUTH, S. M.; GRANATO, D. Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 300-316, 2014.

ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v. 57, p. 307-316, 2002.

**ANEXO I**

**ARTIGO PUBLICADO NO FOOD RESERCH INTERNATIONAL  
(CAPÍTULO 2)**



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

## A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques

Acácio Antonio Ferreira Zielinski<sup>a,b</sup>, Charles Windson Isidoro Haminiuk<sup>a</sup>, Aline Alberti<sup>a</sup>, Alessandro Nogueira<sup>b</sup>, Ivo Mottin Demiate<sup>b</sup>, Daniel Granato<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program of Food Technology, Federal University of Technology - Paraná, Via Rosalina Maria dos Santos 1233 Campo Mourão Campus, CEP 87301-899, Campo Mourão, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Food Engineering, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas Campus, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 May 2013

Received in revised form 5 September 2013

Accepted 13 September 2013

Available online 20 September 2013

#### Keywords:

Multivariate statistics

Cluster analysis

Quality control

Discriminant analysis

Flavonoids

### ABSTRACT

A total of 51 Brazilian teas from the species *Camellia sinensis*, *Peumus boldus*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Pimpinella anisum*, *Mentha piperita*, and *Ilex paraguariensis* were analyzed in terms of phenolic compounds, color and *in vitro* antioxidant capacity using ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assays. Data were processed using principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA) and linear discriminant analysis (LDA). Significant ( $P < 0.01$ ) correlations between antioxidant activity measured by DPPH and FRAP assays with the total phenolic compounds ( $r = 0.87$ ;  $r = 0.90$ , respectively) and flavonoids ( $r = 0.79$ ;  $r = 0.77$ , respectively) were attained. The compounds that displayed significant ( $P < 0.05$ ) correlations with the antioxidant activity were gallic acid, catechin, epicatechin, procyanidin B2, quercetin, and caffeine. PCA was a suitable approach to check for similarities among tea samples, explaining up to 50% of data variability. Four groups were suggested using HCA, in which cluster 3 showed the highest content of total phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, gallic acid, and caffeine. All samples included in this group were from *C. sinensis*. The overall classification capacity obtained by LDA was 82.00%, in which 100% of samples from *I. paraguariensis*, *C. citratus*, *M. recutita*, and *P. boldus* were correctly classified, while 60% of teas from *P. anisum*, 80% of *M. piperita* teas, and 88.24% of *C. sinensis* teas were correctly classified.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Tea is the second most consumed beverage aside from water and has gained much attention due to its health-promoting benefits, including antimutagenic (Bunkova, Marova, & Nemec, 2005), anticancer and antiapoptotic (Cai, Luo, Sun, & Corke, 2004; El-Beshbishy, Tork, El-Bab, & Autifi, 2011), neuroprotective (Mendel & Youdim, 2004), hypoglycemic and antihyperglycemic (Abeywickrama, Ratnasooriya, & Amarakoon, 2011), antioxidant (Morais, Cavalcanti, Costa, & Aguiar, 2009), antimicrobial (Oh, Jo, Cho, Kim, & Han, 2013), and inflammatory effects (Chaudhuri et al., 2005), among others listed by Pinto (2013). These biological activities are associated in part to the antioxidant activity of chemical compounds present in teas, especially flavonoids and phenolic acids. Thus, the evaluation of total and individual quantification of phenolic compounds is essential to correlate with the biological activity.

Characterization of the antioxidant capacity of teas is important to determine their health benefits. Vaquero, Serravalle, de Nadra, and de Saad (2010) assessed the association between antioxidant activity

measured using FRAP and DPPH assays and the content of total phenolic compounds of Argentinean herbs infusions and observed high correlations ( $r > 0.81$ ,  $P < 0.05$ ). Katalinic, Milos, Kulisic, and Jukic (2006) performed a screening of 70 medicinal plant extracts and verified a high correlation between antioxidant capacity measured by FRAP and total phenolic content ( $r = 0.98$ ,  $P < 0.001$ ). In this sense, the antioxidant effectiveness depends on the tea species and the content and type of phenolic compounds present in each species. Atoui, Mansouri, Boskou, and Kefalas (2005) and Bravo, Goyaa, and Lecumberria (2007) verified that phenolic acids and their derivatives were detected in all herbal infusions while the presence of flavonoids varied considerably: catechins were present mainly in *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis*. Thus, it is important to monitor the phenolic composition and the biological activity of teas consumed by a large part of the population in order to correlate their benefits with human health.

The quality control of foods by using multivariate statistical techniques (chemometrics) has increased in many fields of food science and technology once these tools are able to extract the maximum amount of information from chemical data, including chemical composition and antioxidant activity of extracts (Granato, Katayama, & Castro, 2012; Hossain, Patras, Barry-Ryan, Martin-Diana, & Brunton, 2011; Patras et al., 2011). In relation to commercial teas, it is important to

\* Corresponding author at: Department of Food Engineering, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas Campus, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil. E-mail address: [granatod@gmail.com](mailto:granatod@gmail.com) (D. Granato).

**ANEXO II**

**ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
(CAPÍTULO 3)**

## Modelling the extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze)

Acácio Antonio Ferreira Zielinski · Daniel Granato ·  
Aline Alberti · Alessandro Nogueira · Ivo Mottin Demiate ·  
Charles Windson Isidoro Haminiuk

Revised: 25 February 2015 / Accepted: 3 March 2015  
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2015

**Abstract** The aim of this study was to model the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis*) using a simplex-centroid design coupled with multiple regression analysis. White tea showed the highest content of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity, while black tea presented the opposite behaviour. The lowest values found in black tea are due to the oxidation of phenolic antioxidants during the fermentation. Gallic acid, chlorogenic acid, epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin, and epicatechin gallate showed a significant correlation ( $P < 0.05$ ) between all the antioxidant assays. All the mathematical models proposed were significant ( $P < 0.05$ ) and showed high determination coefficients ( $R^2_{adj} > 0.80$ ). A simultaneous optimization was performed using the desirability function and the optimum condition to maximize the extraction of epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, as well as the antioxidant activity (DPPH and FRAP). The results showed that pure white tea was the best solution for obtaining a higher content of antioxidants.

**Keywords** Simplex-centroid design · Response surface methodology · Catechins · Antioxidant activity · High-performance liquid chromatography

### Introduction

Tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) was originally grown in China and later spread to India and Japan, then Europe and Russia, arriving in the New World in the late 17th century (Sharangi 2009). Nowadays, it is the second most consumed beverage apart from water, and some of the best known teas are the green, white and black varieties. The difference observed in these teas is related to the type of process to which they are submitted; green tea is processed by pan-frying or steaming the tea leaves in order to inactive polyphenol oxidase activity (Lambert and Elias 2010). Thus, when it is green, white tea is an unfermented tea; however, the leaves used are made from new growth buds and young leaves of the plant (Pinto 2013). In contrast, the processing of black tea is made with fresh leaves that are crushed and allowed to undergo polyphenol oxidase mediated oxidation of the catechins (Lambert and Elias 2010).

The consumption of tea gives important beneficial effects to the health of consumers, including the following effects: anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, as well as protective effects against degeneration, type 2 diabetes and cardiovascular diseases (Almajano et al. 2008; Yang et al. 2009; Carloni et al. 2013; Pinto 2013). The principal compounds found in teas that are related to these reported effects are flavan-3-ols (catechins). There are several catechins present in *Camellia sinensis* teas, but the major catechins are (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG) and (-)-epicatechin (EC) (Wang et al. 2000a, b).

A. A. F. Zielinski (✉) · A. Alberti  
Graduate Programme of Food Engineering, Federal University of  
Paraná, R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 210, Polytechnic  
Campus, CEP 81531-980 Curitiba, PR, Brazil  
e-mail: aczielinski@gmail.com

D. Granato · A. Nogueira · I. M. Demiate  
Graduate Programme of Food Science and Technology,  
State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748,  
Uvaranas Campus, CEP 84.030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil

C. W. I. Haminiuk  
Graduate Programme of Food Technology, Federal University of  
Technology, Paraná Via Rosalina Maria dos Santos 1233 Campo  
Mourão Campus, CEP 87301-899 Campo Mourão, PR, Brazil

### **ANEXO III**

**ARTIGO ACEITO NO LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
(CAPÍTULO 4)**



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

# Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC–DAD–Q-TOF–MS/MS

Acácio Antonio Ferreira Zielinski<sup>a, c, \*</sup>, Charles Windson Isidoro Haminiuk<sup>b</sup>, Trust Beta<sup>c, d</sup><sup>a</sup> Graduate Programme of Food Engineering, Federal University of Paraná, R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 210, Polytechnic Campus, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil<sup>b</sup> Graduate Programme of Food Technology, Federal University of Technology, Paraná, Via Rosalina Maria dos Santos 1233 Campo Mourão Campus, CEP 87301-899 Campo Mourão, PR, Brazil<sup>c</sup> University of Manitoba, Department of Food Science, 250 Ellis Building, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada<sup>d</sup> University of Manitoba, Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 July 2015

Received in revised form

5 September 2015

Accepted 8 September 2015

Available online 11 September 2015

### Keywords:

Box-Behnken design

Response surface methodology

Flavan-3-ols

Antioxidant assays

## ABSTRACT

The aim of this study was to model the extraction of phenolic antioxidants and identify the principal individual phenolic compounds of white tea by LC-DAD-MS/MS. A Box-Behnken design was applied to evaluate the effects of time, temperature and ethanol concentration in the extraction of phenolics and *in vitro* antioxidant activity. All mathematical models proposed by multiple regression analysis were significant ( $P < 0.001$ ) and could explain up to more than 85% of the variance ( $R^2_{adj} > 0.80$ ). A simultaneous optimization was performed using DPPH, ABTS, FRAP, (–)-epigallocatechin gallate, and (–)-epicatechin gallate to maximize the phenolic extraction and suggested optimum conditions of 10 min, 66 °C and 30% ethanol solution, with absolute error lower than 7%. The suggested optimum conditions were confirmed by external validation. The principal individual compounds identified by mass spectrometry were gallic acid, 5-galloylquinic acid, caffeine, theobromine, gallic acid, epigallocatechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, and epicatechin gallate.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Considered the second beverage most popular after water, tea has received continual interest due to many beneficial health effects that include reducing the risks of cancer, type 2 diabetes and cardiovascular diseases (Kris-Etherton & Keen, 2002; Mukhtar & Ahmad, 2000; Pinto, 2013), besides the antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant capacities that are intensively related (Bansal et al., 2013; Zielinski et al., 2014). A large number of diversified types of teas are produced around the world among which the most popular are black, green, red, yellow, and white teas. The difference between white tea and others, is that the production of white tea (unfermented) is performed using new growth buds and young leaves which are harvested and dried

immediately after (Hilal & Engelhardt, 2007).

The flavan-3-ols are principal bioactive compounds found in unfermented teas from *Camellia sinensis* that exhibit antioxidant activity and free radical scavenging activity (Aron & Kennedy, 2008). Among these, the principal compounds are (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (–)-epigallocatechin (EGC), (–)-epicatechin-3-gallate (ECG), (–)-epicatechin (EC) and (+)-catechin (Wang, Provan, & Helliwell, 2000). In recent studies published by Unachukwu, Ahmed, Kavalier, Lyles, and Kennelly (2010), and Zhao et al. (2011), white tea showed high content of functional compounds and antioxidant activity compared, for example, to the green tea. Therefore, white tea can be a good resource for supplying bioactive compounds with functional properties.

In past years, the link between health problems and preservatives in foods has led to a decrease in the levels permitted with vegetable extracts becoming a new source for the food industry replace the synthetic antioxidants and to supplement the products with bioactive compounds. It is common to find different methods

\* Corresponding author. Graduate Programme of Food Engineering, Federal University of Paraná, R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 210, Polytechnic Campus, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: [aczielinski@gmail.com](mailto:aczielinski@gmail.com) (A.A.F. Zielinski).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.020>

0023-6438/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.